

**ASCORBINSÄURESTOFFWECHSEL-
UNTERSUCHUNGEN
MIT DER ISOTOPENEXKRETIONSMETHODE
BEI KRALLENAFFEN
DER SPEZIES CALLITHRIX JACCHUS**

Günter Siems

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

ASCORBINSÄURESTOFFWECHSEL-

UNTERSUCHUNGEN MIT DER

ISOTOPENEXKRETIONSMETHODE

BEI KRALLENAFFEN

DER SPEZIES CALLITHRIX JACCHUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Günter Siems

aus
Stadtlohn

München, 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

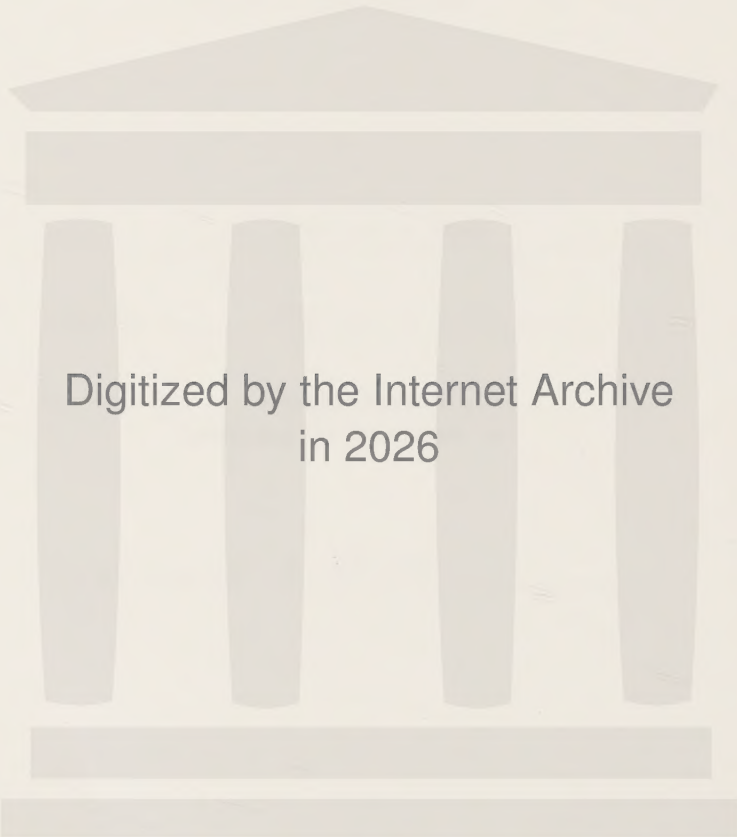
Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meiner Mutter
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0038

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	4
2.1	Biosynthese, Mangelmutanten.....	4
2.2	Resorption, Transport und Verteilung.....	5
2.3	Funktionen.....	7
2.3.1	Verhinderung von Skorbut.....	7
2.3.2	Cofaktor enzymatischer Reaktionen.....	8
2.3.3	Einfluß auf Cholesterin- und Triglyceridstoffwechsel.....	11
2.3.4	Einfluß auf hormonelle Regelkreise.....	12
2.3.5	Vitamin C und Stress.....	14
2.3.6	Interaktionen mit Metallionen.....	15
2.3.7	Einfluß auf das Immunsystem.....	16
2.4	In vitro Katabolismus.....	17
2.5	In vivo Metabolismus.....	18
2.6	Retention und Halbwertszeit.....	23
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	26
3.1	Material und Methoden.....	26
3.1.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	26
3.1.2	Versuchsplanung und -durchführung.....	31
3.1.3	Probengewinnung und -aufbewahrung.....	35
3.1.3.1	Harnproben.....	35
3.1.3.2	Kotproben.....	35
3.1.3.3	CO ₂ -Adsorption aus der Atemluft.....	35
3.1.3.4	Blutproben.....	36
3.1.4	Analytische und radiometrische Methoden.....	36
3.1.4.1	Vitamin C-Metabolitenbestimmung im Harn.....	36

3.1.4.2	Bestimmung der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Aktivität der Vitamin C-Metaboliten im Harn.....	40
3.1.4.3	Bestimmung der Gesamtaktivität im Urin.....	41
3.1.4.4	Bestimmung der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Atemluft.....	41
3.1.4.5	Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in Kot und Blutserum.....	42
3.2	ERGEBNISSE.....	42
4	DISKUSSION.....	80
4.1	$^{14}\text{CO}_2$ Exhalation bei intravenöser und peroraler Gabe des Vitamins.....	80
4.2	$^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei Stress.....	85
4.3	^{14}C -Exkretion im Urin.....	87
4.4	Ascorbinsäuremetaboliten im Urin.....	88
4.5	^{14}C -Exkretion in den Fäzes.....	90
4.6	^{14}C -Retention und Halbwertszeit.....	92
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
	SUMMARY.....	100
	LITERATURVERZEICHNIS.....	102

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit bekannt ist, daß Ascorbinsäure vom Menschen und einigen Tierarten nicht synthetisiert werden kann und eine fehlende exogene Zufuhr bei diesen Spezies zu den Symptomen einer Mangelerkrankung führt, wird Ascorbinsäure als Vitamin C klassifiziert. Vitamine sind essentielle Nährstoffe, die dem Körper in kleinsten Mengen zugeführt werden müssen. Wie hoch die Ascorbinsäurezufuhr sein sollte, ist jedoch umstritten. Zwar schützen schon relativ geringe Ascorbinsäuremengen von 30 mg pro Tag den Menschen vor Symptomen der Mangelerkrankung Skorbut (GINTER, 1979), jedoch hat Vitamin C neben der Verhinderung dieser Hypovitaminose zahlreiche weitere Funktionen. Protagonisten einer Sättigungstheorie empfehlen eine Vitamin C-Aufnahme von 100 mg pro Tag beim Menschen. Dies führt zu einer Ascorbinsäuresättigung von Blut und Geweben, wie sie bei Spezies beobachtet wird, die Vitamin C endogen aufbauen (GOLDSMITH, 1961). Andere Autoren propagieren die Aufnahme von Megadosen dieses Vitamins. Sie sehen bei hoher Ascorbinsäurezufuhr von einem Gramm und mehr beim Menschen einen hilfreichen Effekt bei der Prophylaxe und Therapie von bestimmten Infektionserkrankungen (PAULING, 1970). In jedem Fall muß Ascorbinsäure in viel höheren Dosen als die anderen Vitamine zugeführt werden. Die Klassifizierung der Ascorbinsäure als Vitamin, im Sinne eines essentiellen Nährstoffs, der in kleinsten Mengen zugeführt werden muß, ist daher fragwürdig.

Vitamine haben keine energie- und bausteinliefernden Funktionen, und ihre spezifische biokatalytische Wirkung beruht auf dem Ersatz der dem metabolischen Verschleiß unterliegenden Wirkgruppen von Enzymen. Auch dieser Rahmen

ist für die Ascorbinsäure zu klein. Ascorbinsäure hat außer Co-Funktionen bei einigen Enzymen auch eine Funktion im Regelkreis der Schilddrüsenhormone und des Cortisols, was zu einer Änderung der allgemeinen Stoffwechsellaage bei Mangel an Ascorbinsäure führt. Eine Klassifizierung der Ascorbinsäure als essentieller Nahrungsfaktor aus dem Kohlenhydratstoffwechsel, analog zu den essentiellen Aminosäuren und Fettsäuren, wird vorgeschlagen (DEGKWITZ, 1985).

Die zur Primatenteilordnung der Neuweltaffen zählenden Krallenaffen (Callithricidae) sind als Mangelmutanten auf eine exogene Ascorbinsäurezufuhr angewiesen. Von den übrigen Affen unterscheiden sich diese Tiere durch die krallenartig umgebildeten Nägel, mit Ausnahme eines Plattenagels an der Großzehe. Eine Unterfamilie der Krallenaffen bilden die Marmosets, denen u.a. die Spezies *Callithrix jacchus* (Weißbüscheläffchen) angehört. Weißbüscheläffchen sind relativ kleine Affen mit einem Körpergewicht von 300 bis 500 Gramm, einer Körperlänge von etwa 20 cm und einem 30 cm langen Schwanz. Sie leben als tagaktive Tiere in den tropischen Regenwäldern Südamerikas und betreten als typische Baumbewohner kaum den Erdboden. Ihre Nahrung besteht aus Früchten, Nüssen, Blättern, Vogeleiern, Insekten und kleinen Wirbeltieren sowie aus den nach Durchnagen der Rinde bestimmter Baumsorten gewonnenen Säften. Den Flüssigkeitsbedarf decken die Tiere ferner durch Auflecken von Regentropfen und durch den Wassergehalt ihrer Nahrung. In ihrer natürlichen Umgebung bilden 2 bis 6 Individuen eine Familie.

Krallenaffen, darunter vor allem die Spezies *Callithrix jacchus*, werden in den letzten Jahren zunehmend in der medizinischen Forschung eingesetzt. Sie sind relativ leicht zu halten und zu züchten, besitzen eine hohe Reproduktionsrate, haben für Primaten einen geringen Intelligenzgrad

und sind für eine Reihe humanpathogener Viren empfänglich. Der wachsende Bedarf an Krallenaffen in der Virologie, Pharmakologie, Toxikologie und Endokrinologie muß fast ausschließlich aus Zuchtkolonien gedeckt werden, da die Ursprungsländer den Export dieser Tiere verboten haben.

Für Gesundheit und Reproduktion der Tiere in der Zuchtkolonie, aber auch für das Erzielen von unverfälschten Versuchsergebnissen in der Forschung, ist eine bedarfsge-
rechte Ernährung der Tiere notwendig. Gegenüber anderen Affen und dem Menschen haben Krallenaffen der Spezies *Callithrix jacchus* einen mehrfach höheren Ascorbinsäurebedarf. Eine tägliche Zufuhr von 20 mg/kg Körpergewicht führt zu Serumspiegeln oberhalb der Nierenschwelle (KERN, 1986). Stress, dem diese Tiere bei Haltung in Gefangenschaft sowie bei Studien zur wissenschaftlichen Forschung unterliegen, läßt ihren Vitamin C-Bedarf ansteigen und führt zu einer vermehrten Verstoffwechselung des Vitamins zu CO_2 (GEYER, 1987).

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, in welcher Weise Stress den Vitamin C-Metabolismus beim Krallenaffen der Spezies *Callithrix jacchus* beeinflusst. Es wurde insbesondere der Frage nachgegangen, wie die Verstoffwechselung von Ascorbinsäure zu CO_2 bei intravenöser gegenüber peroraler Zufuhr verläuft, um die Möglichkeit einer eventuell präresorptiven Decarboxylierung gegen die postresorptive Oxidation des Vitamins abzuwägen. Desweiteren wurde angestrebt, die bisher unbekannten Metaboliten der Ascorbinsäure im Urin dieser Tiere aufzutrennen, zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Es galt, ein Verfahren zu entwickeln, das die Auftrennung von Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, 2,3-Diketoquolonsäure und Oxalsäure in einem Arbeitsgang, bei einer möglichst niedrigen Nachweisgrenze, ermöglichen sollte.



2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Biosynthese, Mangelmutanten

Viele Tierarten sind zur endogenen Ascorbinsäuresynthese aus Kohlenhydraten wie Galaktose und Glucose fähig. Diese erfolgt bei Amphibien, Reptilien und den meisten Vögeln in der Niere, bei Säugern dagegen in der Leber (CHATTERJEE, 1975). Viele Insekten, Wirbellose und Fische können, ebenso wie das Meerschweinchen, die Fledermaus, der Mensch und mit ihm fast alle Primaten, Vitamin C selbst nicht aufbauen (CHATTERJEE et al., 1975). Diese Tiere sind auf eine Zufuhr von Ascorbinsäure angewiesen, da ihnen das Enzym zur Umwandlung von D-Glucuronsäure in L-Ascorbinsäure fehlt (CHATTERJEE et al., 1961). Spezifische Antikörper gegen das Enzym Gulonolactonoxidase, welches diesen Syntheseschritt katalysiert, zeigen keine dieses Enzym nachweisende Reaktion in den Mikrosomen der Leber von Meerschweinchen und Mensch. Diesen Spezies fehlt das den Proteinanteil dieses Enzyms codierende Gen (SATO and UDENFRIEND, 1978). Wird einem Meerschweinchen gleichzeitig D-Glucuronsäure und Gulonolactonoxidase parenteral verabreicht, so kann eine C-Hypovitaminose verhindert werden (SATO, 1980). Neben der Gulonolactonoxidase sollen zwei weitere, zur Ascorbinsäuresynthese notwendige Enzyme, nämlich die Gulonsäurelaktonreduktase und die Aldonolactonase, den Mangelmutanten fehlen (BÄSSLER und LANG, 1981).

Die Fähigkeit von Mensch und Meerschweinchen, Ascorbinsäure im Darm durch einen aktiven Transportmechanismus zu resorbieren (HORNIG et al., 1973), das vermutliche Fehlen der Dehydroascorbinsäurelaktonase bei Mensch und Affe,

welche bei anderen Tierspezies den irreversiblen Abbau von Vitamin C zu 2,3-Diketogulonsäure katalysiert (SCHMIDT et al., 1983), die relativ geringe Oxidationsrate von Ascorbinsäure zu CO_2 beim Menschen (BAKER et al., 1966), sowie die um ein Vielfaches längere biologische Halbwertszeit von Vitamin C beim Menschen gegenüber Tieren, die Ascorbinsäure aufbauen können (siehe 2.6.), werden als mögliche Adaptation beim Transport und Abbau der Ascorbinsäure bei Mangelmutanten diskutiert (GINTER, 1979; DEGWITZ, 1985).

2.2 Resorption, Transport und Verteilung

Bei Mensch und Meerschweinchen, die auf eine exogene Zufuhr von Vitamin C angewiesen sind, wird die mit der Nahrung aufgenommene Ascorbinsäure durch einen aktiven, sättigbaren, Na^+ -abhängigen, elektroneutralen, Carrier-vermittelten Transportmechanismus resorbiert (STEVENSEN and BRUSH, 1969; STEVENSON, 1974; TOGGENBURGER et al., 1979). Die Resorption erfolgt bei diesen Spezies im Duodenum und proximalen Jejunum (HORNIG et al., 1973). Bei einer peroralen Verabreichung bis zu 180 mg pro Tag werden beim Menschen durchschnittlich 84% resorbiert (KALLNER et al., 1977). Mit steigender Zufuhr nimmt die Resorptionsrate ab und beträgt bei einer Aufnahme von 1,5 g 50% und bei 12 g nur noch 16% der verabreichten Ascorbinsäure (KÜBLER und GEHLER, 1979). Wird die Ascorbinsäure vom Menschen mit zusätzlicher Nahrung aufgenommen, steigt die Resorptionsrate aufgrund einer längeren Passagezeit im Darm (YUNG et al., 1981).

Bei der Ratte und beim Hamster, die Vitamin C endogen synthetisieren, wird Ascorbinsäure mittels passiver Diffusion aufgenommen (SPENCER et al., 1963). Diese Aufnahme erfolgt

bei der Ratte vorwiegend im Ileum (HORNIG et al., 1973).

Ascorbinsäure liegt im Blutplasma des Menschen hauptsächlich als freies Anion vor (OLSON and HODGES, 1987). Bevorzugt in seiner oxidierten Form, Dehydroascorbinsäure, gelangt Vitamin C durch Diffusion in neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Erythrozyten (HORNIG, 1971). Ein aktiver, sättigbarer Transportmechanismus wurde für die Aufnahme der reduzierten Form, der Ascorbinsäure, in Nebenniere, Hypophyse, Gehirn und Augenlinse verschiedener Spezies nachgewiesen (HORNIG, 1973; MOSER, 1987). Bei Meerschweinchen steigen die Ascorbinsäurespiegel von Leber, Muskel, Nebennieren, Milz und Gehirn bei zunehmendem Gehalt im Futter zunächst an, erreichen dann aber ein Maximum, auch wenn die Blutspiegel noch weiter ansteigen. Maximale Ascorbinsäurespiegel treten dabei zuerst in den Organen auf, die wie Gehirn und Nebenniere über einen aktiven Transportmechanismus verfügen, während die Leber, für die kein solcher Transportmechanismus bekannt ist, erst bei sehr hoher Vitamin C-Zufuhr ihren maximalen Spiegel erreicht (DEGKWITZ, 1985).

Beim Menschen werden die höchsten Ascorbinsäurekonzentrationen in der Nebenniere und in der Hypophyse nachgewiesen. Leber, Milz und Gehirn zeigen zwar geringere Vitamin C-Konzentrationen, enthalten aber aufgrund der größeren Organmasse die Hauptmenge der Ascorbinsäurereserven (KALLNER et al., 1979). So finden sich bei "normaler" Ascorbinsäureversorgung in Nebenniere und Hypophyse 30-50 mg, in Leber und Niere dagegen nur 10-15 mg pro 100 g Organsubstanz. Nach Verabreichung einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure lassen sich beim Meerschweinchen die höchsten Aktivitäten im ZNS, in Nebennieren, Hypophyse, Speicheldrüsen, Milz, Hoden, in der Augenlinse und im Knochenmark nachweisen (HORNIG, 1975).

2.3 Funktionen

2.3.1 Verhinderung von Skorbut

Der Name Ascorbinsäure leitet sich von den sauren und antiscorbutischen Eigenschaften des Vitamins ab. Skorbut ist eine Vitamin C-Mangelerkrankung, die nur bei Spezies auftreten kann, die zu einer endogenen Synthese der Ascorbinsäure nicht fähig sind. Bei Skorbut beobachtet man Symptome, die vor allem die mesenchymalen Gewebe betreffen: Gingivitis mit Hypertrophie des Zahnwalls, Hämorrhagien, Hämaturie, Melanie, Metrorrhagien, subperiostale und intramuskuläre Blutungen sowie Hyperkeratosen. Weiterhin läßt die Resistenz gegen Infektionen nach, die Wundheilung ist verzögert, die Kallusbildung bei der Heilung von Frakturen verschlechtert sich, und es kommt zu einer mangelhaften Dentinbildung. Eine besondere Ausprägung des Skorbut, die bei Säuglingen auftritt, die ausschließlich mit der relativ Vitamin C-armen Kuhmilch ernährt werden, ist die Möller-Barlow-Erkrankung, bei der Störungen der Knochenbildung im Vordergrund stehen (BÄSSLER und LANG, 1981).

Die Verhinderung von Skorbut ist die seit längstem bekannte Funktion von Vitamin C. Heute werden auch in Industrieländern noch Fälle von subklinischem Skorbut festgestellt. Betroffen sind vor allem Menschen mit sehr einseitigen Ernährungsgewohnheiten, z.B. Alkoholiker. Eine C-Hypovitaminose kann auch bei einem erhöhten Ascorbinsäurebedarf auftreten, der durch Rauchen (KALLNER et al., 1981), Alkoholgenuß (DE FAZIO et al., 1981), orale Kontrazeptiva (WEININGER and KING, 1982), und "Krankheit" (MURPHY et al., 1974) verursacht sein kann. Neben der Verhinderung einer C-Hypovitaminose ist Ascorbinsäure an

einer Vielzahl biochemischer Reaktionen beteiligt, die in der Mehrzahl nicht eindeutig den Erscheinungen der Mangelkrankheit Scorbut zuzuordnen sind und sich auch bei gerade ausreichender Skorbutprophylaxe noch nicht normalisieren. Das heißt, daß eine Bedarfsangabe zur Skorbutprophylaxe nicht als ausreichend für eine optimale Versorgung angesehen werden kann (LEVINE, 1986).

2.3.2 Cofaktor enzymatischer Reaktionen

Ascorbinsäure hat ein Redoxpotential von +0,08 V und ist daher leicht autooxidabel und ein kräftiges Reduktionsmittel. Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure bilden ein Redoxsystem, in dem die Semidehydroascorbinsäure als reaktionsfähige Zwischenstufe auftritt. Bei vielen Reaktionen im Intermediärstoffwechsel, bei denen Ascorbinsäure oder Dehydroascorbinsäure beteiligt ist, spielt dieses Redoxsystem eine Rolle. Ascorbinsäure dient zwar nicht als Coenzym wie andere Vitamine, ist aber Cofaktor enzymatischer Reaktionen. Ascorbinsäure ist Cofaktor bei Hydroxylierungsreaktionen, die Fe^{++} , alpha-Ketoglutarat und molekularen Sauerstoff benötigen. Der Wirkungsmechanismus der Ascorbinsäure scheint darin zu bestehen, daß sie enzymgebundenes Fe^{+++} zu Fe^{++} reduziert am Ende eines katalytischen Zykluses (ENGLARD and SEIFTER, 1986). Ascorbinsäure ist beteiligt an der Synthese von Carnitin aus Lysin, die zwei Hydroxilierungsschritte einschließt. Vitamin C-freie Diät führt beim Meerschweinchen zu einem signifikanten Abfall von Carnitin in Skelett- und Herzmuskel (HUGHES et al., 1980). Carnitin ist wichtig beim Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien, wo diese zur Energiegewinnung oxidiert werden. Gerade der Skelettmuskel ist abhängig von Fettsäuren zur Energiege-

winnung. Carnitin kann allerdings exogen mit der Nahrung zugeführt werden.

Bei der Hydroxylierung von peptidgebundenen Prolin- und Lysinresten zur Kollagensynthese ist Ascorbinsäure ebenfalls als Cofaktor beteiligt (DE JONG et al., 1982; MYLLYA et al., 1984). Ob Symptome des Skorbuts wie Blutungen und Bindegewebsschäden auf eine mangelhafte Hydroxylierung von Prolin und Lysin im Protokollagen zurückzuführen sind, ist fraglich. In vitro-Studien zeigen, sich daß bei Vitamin C-Mangel in Zellkulturen durch Zufuhr von Ascorbinsäure die zuvor verminderte Prolinhydroxylierung normalisiert, während die Kollagensynthese weiterhin reduziert bleibt (CHOJKIER et al., 1984). Eine Störung übergeordneter Regulationsmechanismen der Kollagensynthese ist denkbar (LEVINE, 1986).

Erhöhte Cortisolblutspiegel, wie sie bei Vitamin C-Mangel auftreten, haben einen katabolen Effekt auf das Bindegewebe. Da Bindegewebsschäden beim Meerschweinchen bereits nach 2 bis 3 Wochen extrem ascorbinsäurearmer Diät manifest sind, obwohl die Halbwertszeit des Kollagens viele Wochen beträgt, ist bei Vitamin C-Mangel kausal die katabole Mitwirkung des Cortisols anzunehmen (DEGKWITZ, 1985).

Auch die Synthese von Corticosteroiden in den Nebennieren beinhaltet Hydroxylierungsreaktionen. Die Aktivität der beteiligten Enzyme 11- β -Hydroxylase und C-21-Hydroxylase wird durch Ascorbinsäure in vitro gehemmt (KITABCI, 1977; GREENFIELD et al., 1980).

Ascorbinsäure ist notwendig für eine optimale Funktion der an den genannten Hydroxylierungsreaktionen beteiligten Enzyme. Sie kann durch andere Reduktionsmittel in vitro ersetzt werden, wobei die Enzyme aber nicht ihre maximale Aktivität erreichen (LEVINE, 1986). Dies gilt auch für mischfunktionelle Oxidasen, bei deren Funktion Ascorbin-

säure als Cofaktor beteiligt ist. Ascorbinsäure dient als Wasserstoffdonator bei der Hydroxylierung von Dopamin zu Noradrenalin durch Dopamin- β -Hydroxylase (ULLRICH and DUPPEL, 1975). Eine weitere mischfunktionelle Oxidase, deren Funktion durch Ascorbinsäure beeinflusst wird, ist die Hydroxyphenyl-pyruvatoxidase, die am Abbau von Thyrosinmetaboliten beteiligt ist. Bei Skorbut ist der Abbau von Thyrosin behindert, und es wird mit dem Urin Homogentisinsäure ausgeschieden (LADU and ZANNONI, 1961). Im mischfunktionellen Oxidasesystem des Meerschweinchens führt Ascorbinsäuremangel zu einer verminderten Aktivität der mikrosomalen Hydroxylierungs- und Demethylierungsprozesse und reduziert den damit verbundenen mikrosomalen Elektronentransport (WEIS, 1975).

Damit ist die Fähigkeit, bestimmte Pharmaka abzubauen, herabgesetzt. Meerschweinchen, die nur marginal mit Ascorbinsäure über das Futter versorgt werden, schlafen nach parenteraler Gabe eines Barbiturats länger als Tiere, deren Vitamin C-Bedarf gedeckt ist. Die Tiere mit niedrigem Ascorbinsäure-Versorgungsstatus zeigen einen verminderten Gehalt an Cytochrom P_{450} , das beim Abbau der Pharmaka beteiligt ist (DEGKWITZ, 1985).

Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Ascorbinsäure auf das vom mikrosomalen Cytochrom P_{450} der Leber abhängige mischfunktionelle Oxidasesystem ist die Beeinflussung des Enzyms Cholesterol-7- α -hydroxylase, das die Transformation von Cholesterin zu Gallensäuren katalysiert. Zwar führt Ascorbinsäurezufuhr beim diesbezüglich bedarfsgerecht ernährten Meerschweinchen zu keiner direkten Stimulierung dieses Enzyms, Ascorbinsäuremangel aber senkt die enzymatische Aktivität. Mögliche Ursache dafür ist auch hier der bei Ascorbinsäuremangel nachzuweisende reduzierte Cytochrom P_{450} -Gehalt in den Mikrosomen der Leber dieser Tiere (BJÖRKHEM and KALLNER, 1976).

2.3.3 Einfluss auf den Cholesterin- und Triglyceridstoffwechsel

Vitamin C-arme Diät führt bei Meerschweinchen zu erhöhten Cholesterinspiegeln in Blut und Geweben (GINTER, 1979). Die bei Ascorbinsäuremangel verminderte Aktivität des Enzyms Cholesterol-7- α -hydroxylase (siehe 2.3.2) verursacht gleichzeitig einen verminderten Gehalt an Gallensäuren in den Fäces (HARRIS et al., 1976). Umgekehrt senkt Ascorbinsäure den Cholesterinspiegel des Blutes bei Meerschweinchen, wenn viel Cholesterin mit der Nahrung aufgenommen und Ascorbinsäure in hohen Mengen zugeführt wird (WEISER et al., 1976). Ist jedoch der Anteil des Cholesterins im Futter größer als 1%, hat eine hohe Vitamin C-Zufuhr keinen Einfluß mehr auf den Cholesterinspiegel des Blutes (OSTWALD et al., 1977).

Auch bei Marmosets (McINTOSH et al., 1981) und bei Pavianen (KOTZE et al., 1974) wird bei Vitamin C-Mangel Hypercholesterinämie beobachtet. Diese ist bei Pavianen jedoch nicht so ausgeprägt wie bei mangelversorgten Meerschweinchen, da Paviane die endogene Cholesterinsynthese unter diesen Umständen zu senken vermögen (WEIGHT et al., 1974).

Hohe Vitamin C-Versorgung führt bei Ratten und Meerschweinchen zu einem Abfall der Triglyceride im Blut, verbunden mit einer gesteigerten Lipoproteinlipaseaktivität in Blut und Fettgeweben (KAMATH et al., 1977). Beim Menschen hat Ascorbinsäure keinen Einfluß auf den Plasmacholesterinspiegel, wenn dieser im physiologischen Bereich bis zu 200 mg/100 ml beträgt (GINTER et al., 1979). In Langzeitstudien mit ausgesuchten Probanden, die neben einem geringen Vitamin C-Status erhöhte Cholesterin- und Triglyceridspiegel im Plasma aufwiesen, bewirkte hohe Vitamin C-Zufuhr in vielen Fällen einen Abfall der Plasma-

lipide (GINTER et al., 1977).

Vitamin C-arme Diät führt beim Meerschweinchen zu einer fettigen Leberdegeneration. Ein Zusatz von Cholesterin zu dieser Diät führt zu Leberzirrhose und Proliferation der Gallengänge. Gleichzeitig ist bei diesen Tieren die Aktivität des mikrosomalen Hydroxylierungs- und Demethylisierungssystems, die Aktivität der Komponenten des mikrosomalen Elektronentransports und des Enzyms Cholesterol-7-alpha-hydroxylase deutlich reduziert (GINTER, 1979). Eine Vitamin C-arme und fettfreie Diät verursacht bei Hamstern eine Hypercholesterinämie und infolgedessen sehr häufig die Bildung von Gallensteinen. Ein Vitamin C-Zusatz von 0,5% in dieser Diät senkt den Plasmacholesterinspiegel und reduziert die Häufigkeit von Cholelithiasis bei diesen Tieren (GINTER and MINKUS, 1977). Beim Menschen zeigen Kurzzeituntersuchungen keinen hemmenden Einfluss von Vitamin C auf die Bildung von Gallensteinen (PEDERSON, 1975). Vitamin C-arme Ernährung verursacht beim Meerschweinchen eine vermehrte Ablagerung von Cholesterin in der Aorta (GINTER et al., 1969). Bei chronischer C-Hypovitaminose zeigt sich hier eine ausgeprägte Proliferation des Gefäßendothels (SULKIN and SULKIN, 1975). Latente C-Hypovitaminose könnte daher ein ätiologischer Risikofaktor sein für die Pathogenese der Atherosklerose (GINTER, 1979).

2.3.4 Einfluß auf hormonelle Regelkreise

Ascorbinsäure hat außer den genannten Funktionen auch Bedeutung im Regelkreis der Schilddrüsenhormone und des Cortisols, was zu einer Änderung der allgemeinen Stoffwechsellage bei Mangel an Ascorbinsäure führt. Beim Meerschweinchen sind bei einer über dem Bedarf liegenden

Vitamin C-Versorgung von 680 mg/100 g Futter die Blutspiegel der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 um 100% bzw. 30% erhöht. Die Biosynthese und Sekretion dieser Hormone in der Schilddrüse wird über die Achse Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen durch einen negativen feedback-Mechanismus reguliert. Dieser Regelkreis ist möglicherweise bei hohen Ascorbinsäurekonzentrationen im Blut verstellt, was zu erhöhten Spiegeln dieser Hormone im Blut führt. Da Schilddrüsenhormone den Grundumsatz des Organismus steigern und mit einem erhöhten Grundumsatz Infektionen besser bekämpft werden können, bietet diese Ascorcorbinsäurefunktion eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Erfolge bei der Behandlung von Erkältungskrankheiten mit Vitamin C (siehe 2.3.6.). Erfolge wären demnach nur zu erwarten, wenn ein Großteil der Probanden eine Stoffwechsellage hat, die durch Ascorbinsäure verbessert werden kann (DEGKWITZ, 1985).

Den Ergebnissen dieser Studie stehen Untersuchungen an Vitamin C-hochversorgten Ratten gegenüber, bei denen verminderte Serum- T_3 -Konzentrationen auftraten. Bei diesen Tieren stieg der T_3 - und T_4 -Gehalt in der Schilddrüse bei hohen parenteralen Vitamin C-Gaben, während der TSH-Serumspiegel abfiel (MARCUSEN and HENNINGER, 1976). Diese Autoren sehen einen inhibitorischen Effekt hoher Ascorbinsäuredosen auf die Freisetzung von TSH.

Ein weiteres Beispiel für den möglichen Einfluß von Vitamin C auf einen hormonellen Regelkreis ist der Effekt von unterschiedlich hoher Ascorbinsäurezufuhr auf die Nebennierenfunktion. Meerschweinchen, die nur marginal mit Vitamin C versorgt waren, schieden um etwa 50% mehr Cortisol binnen 24 Stunden mit dem Harn aus gegenüber einer Kontrollgruppe mit bedarfsdeckender Vitamin C-Zufuhr. Bei den Blutcortisolwerten der marginal versorg-

ten Tiere war die 24 Stunden-Tag/Nacht-Rhythmik verwischt, ein Symptom, das auf eine zu hohe Biosynthese von Cortisol schließen läßt. Bei Mangel an Ascorbinsäure könnte daher der Regelkreis des Cortisols durch einen unbekannten Mechanismus verstellt sein (DEGKWITZ, 1985).

Asorbinsäure hat aber auch direkten Einfluß auf die Corticosteroidsynthese. Die Aktivität der Enzyme 11- β -Hydroxylase und C-21-Hydroxylase, die an der Synthese von Corticosteroiden in den Nebennieren beteiligt sind, wird durch Ascorbinsäure in vitro gehemmt (KITABI, 1977; GREENFIELD et al., 1980). Andererseits führt die Verabreichung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welches Synthese und Freisetzung der Corticosteroide bewirkt, beim Meerschweinchen zu einem rapiden Abfall der Ascorbinsäure in den Nebennieren (HODGES and HOTSTON, 1970). Gleichzeitig sinkt der Cholesterinspiegel in den Nebennieren und steigt im Blutplasma. Da Cholesterin zur Corticosteroidsynthese benötigt wird, ist denkbar, daß diese Vitamin C-abhängig verläuft (KITABCI and WEST, 1975).

2.3.5 Vitamin C und "Streß"

Wenn ein Tier belastenden Reizen ausgesetzt wird, kommt es zum raschen Anstieg von ACTH, das die Nebennierenrinde zur Sekretion von Glucocorticoiden stimuliert. Dieser Streßzustand bewirkt den Abfall der Asorbinsäuregehalte in Nebennieren und Blut bei gleichzeitig erhöhten Serumcholesterinspiegeln. Umgekehrt führt Vitamin C-Mangel zu erhöhten Cortisonkonzentrationen im Blut (ODUMOSU, 1984). Streß führt zu einem beschleunigten Abbau von Vitamin C und bewirkt dadurch einen erhöhten Vitamin C-Bedarf. Bei

Makaken verursacht die Belastung, die durch Fesselung an einen Primatenstuhl ausgelöst wird, nach oraler Gabe von markierter Ascorbinsäure eine vermehrte Exhalation von $^{14}\text{CO}_2$ und eine erhöhte Exkretion von ^{14}C -Aktivität mit dem Urin (TILLOTSEN and O'CONNOR, 1981). Bei aus der Wildnis frisch eingefangenen grünen Meerkatzen wurden im Serum stark reduzierte Vitamin C-Konzentrationen gemessen. Binnen einer Eingewöhnungszeit stiegen diese um mehr als das Doppelte wieder an, sanken aber nach induziertem Streß deutlich wieder ab (DE KLERK et al., 1973a). Ein Abfall des Serumascorbatspiegels ist auch bei Pavianen in den ersten Gefangenschaftstagen zu beobachten. Gleichzeitig sind die Serumcholesterinspiegel der Tiere erhöht. Bei unterschiedlich hohen Vitamin C-Gaben zeigten diejenigen Tiere die höchsten Serumcholesterinkonzentrationen, denen relativ die geringste Menge Ascorbinsäure appliziert wurde (DE KLERK et al., 1973b).

2.3.6 Interaktionen mit Metallionen

Interaktionen zwischen Ascorbinsäure und Schwermetallionen beschreiben HORNIG et al., (1983). Vitamin C erhöht die Resorptionsrate für nicht-hämoglobingebundenes Eisen aus der Nahrung bis auf das Siebenfache. Sie ist beim Menschen direkt proportional zur Ascorbinsäurezufuhr, wenn diese zwischen 25 und 1000 mg liegt. Zwischen Eisen- und Kupferresorption bestehen Wechselwirkungen, und so führt eine hohe Vitamin C-Versorgung zu einer verminderten intestinalen Aufnahme von Kupfer. Die gleichzeitige Verabreichung von Calcium und Ascorbinsäure erhöht die Calciumresorption im Darm von Ratten (MORCOS et al., 1976). Beim Menschen hat Vitamin C keinen Einfluss auf die Calcium- und Zinkresorption (SANDSTRÖM and CEDERBLAD, 1986).

Vitamin C verringert die intestinale Resorption von Cadmium. Da der Vitamin C-Status allein keinen Einfluss auf die Aufnahme dieses Schwermetalls im Darm hat, muß Ascorbinsäure zusammen mit Cadmium oral zugeführt werden, um dessen Resorption reduzieren zu können. Weiterhin vermag Vitamin C den Organismus bis zu einem gewissen Grad vor den schädlichen Folgen, die durch die Aufnahme der Schwermetalle Nickel, Blei und Vanadium verursacht werden, zu schützen (HORNIG et al., 1983).

2.3.7 Einfluss auf das Immunsystem

Vitamin C verbessert die Immunantwort auf zellulärer und humoraler Basis (BEISEL, 1982). Beim Menschen stimuliert Ascorbinsäure die Migration neutrophiler Granulozyten in vitro und in vivo (ANDERSON, 1981; 1982). Hohe Vitamin C-Gaben von 50 mg pro kg Körpergewicht und Tag bewirken eine Steigerung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und führen zu einer deutlich reduzierten Infektionsrate bei Menschen, die an einer vererbten Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten erkrankt sind (PATRONE et al., 1982). In vitro bewirken hohe Ascorbinsäurekonzentrationen eine Steigerung der Migration und Chemotaxis in Leukozyten des Menschen (GOETZL et al, 1974). Ascorbinsäure moduliert den Spiegel zyklischer Nukleotide sowohl in B- als auch in T-Lymphozyten, ein Vorgang, der möglicherweise Immunprozesse reguliert (PANUSH et al., 1982). VALLENCE (1977) beschreibt eine Steigerung der Serumspiegel von IgA und IgG bei Individuen mit hoher Ascorbinsäurezufuhr. Zwischen Ascorbinsäuregehalt und Histaminkonzentration im Blut läßt sich eine negative Korrelation nachweisen, d.h. hohe Vitamin C-Gaben senken den Bluthistaminspiegel (CLEMTSON, 1980). Bei allergischen Reaktionen sind die Leukozyten-

und Gewebsspiegel von Ascorbinsäure erniedrigt. Andererseits ist Vitamin C unerlässlich für die Freisetzung kleiner Mengen von Histamin aus den Zellen. Wie Ascorbinsäure den Histaminspiegel reguliert, ist noch unklar (SHARMA et al., 1981).

Ob Vitamin C-Megadosen die Häufigkeit von Erkältungskrankheiten verringern, bei Erkrankung die Symptome lindern und die Krankheitsdauer verkürzen, bleibt aufgrund zahlreicher widersprüchlicher Ergebnisse in vergleichbaren Studien umstritten.

Die Bildung von karzinogenen Nitrosaminen wird durch Ascorbinsäure in vitro (MIRVISH et al., 1972) und in vivo (REED et al., 1982) verhindert. Der Einsatz von Vitamin C zur Therapie von Karzinomen ist dagegen umstritten.

2.4 In vitro Katabolismus

In Leberhomogenaten von Ratten und Rindern läßt sich das Enzym Dehydroascorbinsäurelaktonease nachweisen, welches die Aufspaltung des Laktonrings der Dehydroascorbinsäure zur 2,3-Diketogulonsäure katalysiert (KAGWA et al., 1961; KAGWA and TAKIGUCHI, 1962). Dieses Enzym fehlt vermutlich den Primaten (KLAIN et al., 1981). In Leber- und Nierenhomogenaten von Ratte und Meerschweinchen wurde CO_2 aus 2,3-Diketogulonsäure von einem wenig spezifischen Decarboxylierungssystem abgespalten (BURNS et al., 1958). Dieses Enzymsystem ist auch in der Leber von Mensch und Makaken zu finden (KAGWA, 1962).

Als Decarboxylierungsprodukte konnten in Rattennieren die L-Lyxonsäure und die L-Xylonsäure identifiziert werden (KANFER et al., 1960). Geringe Mengen von ^{14}C -Oxalsäure entstehen aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure in Rattenleberhomo-

genaten. Dieser nichtenzymatische Prozeß läßt sich unter Schaffung eines alkalischen Milieus sowie aerober Bedingungen beschleunigen (KAGWA, 1962). Zugabe von Dehydroascorbinsäure zu Leberhomogenaten führt zu einer verstärkten CO_2 -Produktion aus 2,3-Diketogulonsäure, welche mittels der Dehydroascorbinsäuredehydrogenase entsteht (SCHMIDT et al., 1983). Aus L-Ascorbinsäure entsteht durch die aus der Leber von Ratten isolierte Catechol-O-methyltransferase die 2-Methylascorbinsäure (BLASCHKE and HERRTING, 1971). In vitro läßt sich auch die Entstehung von Ascorbinsäure-2-sulfat mittels der Ascorbat-sulfhydrase in Rattenleberhomogenaten nachweisen (TOLBERT et al., 1973).

2.5 In vivo Metabolismus

Vergleichbare Untersuchungen zum Vitamin C-Metabolismus in vivo mittels einer Radioisotopenexkretionsmethode liegen beim Menschen, verschiedenen Affen, Meerschweinchen sowie bei der Ratte vor. Nach Verabreichung von 1- ^{14}C -Ascorbinsäure kann bei diesen Spezies die Exkretion von Aktivität in Atemluft, Urin und Kot nachgewiesen werden. Hauptausscheidungsweg bei Meerschweinchen und Ratte ist die Exhalation von $^{14}\text{CO}_2$ über die Atemluft. Nach intraperitonealer Injektion markierter Ascorbinsäure atmen Meerschweinchen innerhalb von 10 Tagen 66% der Aktivität in Form von $^{14}\text{CO}_2$ aus, dabei allein 30 bis 40% in den ersten 24 Stunden (BURNS et al., 1956). Bei der Ratte werden insgesamt 30-40% einer oral verabreichten 1- ^{14}C -Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ oxidiert (CURTIN and KING, 1955).

Die Gabe von markierter Dehydroascorbinsäure bzw. 2,3-Diketogulonsäure führt bei Meerschweinchen und Ratte

zu einem noch höheren Anteil der Eliminierung von Aktivität über die Atemluft, was darauf schließen läßt, daß der Abbau von Ascorbinsäure zu CO_2 bei diesen Spezies über diese Zwischenprodukte erfolgt (DAYTON et al., 1966). Die Verstoffwechselung von Vitamin C zu CO_2 steigt zwar beim Meerschweinchen mit dem Ascorbinsäuregehalt des Futters (ABT and VON SCHUCHING, 1961), eine einmalige Verabreichung einer hohen Ascorbinsäuredosis führt jedoch bei dieser Spezies zu keiner erhöhten Verstoffwechselung zu CO_2 (HORNIG et al., 1973). Das Maximum der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation tritt beim Meerschweinchen schon eine halbe Stunde nach Verabreichung einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure auf. Da maximale Ascorbinsäurespiegel im Plasma und rasch durchbluteten Organen wie Lunge, Leber und Nieren erst nach 1,5 Stunden gemessen wurden und ein Abbau der Ascorbinsäure im sauren Darmmilieu den Autoren wenig wahrscheinlich erscheint, halten sie den Abbau zu Kohlendioxid in der Darmwand für wahrscheinlich (HORNIG and HARTMAN 1982). Diese Annahme steht im Widerspruch zu in vitro-Untersuchungen, bei denen nach Zugabe von Ascorbinsäure weder in Homogenaten von Magen und Darm noch von Dünndarmflora CO_2 in nennenswerten Beträgen freigesetzt wurde (SCHMIDT et al., 1983). Aus der verstärkten CO_2 -Entwicklung aus Leberhomogenaten nach Zugabe von Dehydroascorbinsäure schlossen SCHMIDT et al., daß die Leber Ort der CO_2 -Produktion ist und die Oxidation zu CO_2 erst nach Abbau von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure und 2,3-Diketogulonsäure erfolgt. Das zur Aufspaltung des Laktonrings nötige Enzym Dehydroascorbinsäuredehasktonase ist von den Autoren in der Leber von Ratte und Meerschweinchen nachgewiesen worden.

Mit dem Urin scheiden Ratten und Meerschweinchen innerhalb von 24 Stunden zwischen 5% und 10% der Aktivität einer

oral verabreichten 1-¹⁴C-Ascorbinsäure wieder aus, und zwar allein 7% als Oxalat und 2-3% als Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und 2,3-Diketogulonsäure. Als weitere Metaboliten sind bei der Ratte die 2-O-Methylascorbinsäure (BLASCHKE and HERRTING, 1971) und die Saccharoascorbinsäure (HORNIG et al., 1983) sowie bei Ratte und Meerschweinchen Ascorbinsäure-2-sulfat (BAKER et al., 1971), jeweils in geringen Mengen, nachgewiesen. Mittels der Radioisotopenexkretionsmethode wurden im Urin des Meerschweinchens zahlreiche weitere Metabolite isoliert, die zum größten Teil nicht identifiziert werden konnten (KARR et al., 1968). In den Fäces von Meerschweinchen finden sich weniger als 1% der Aktivität einer oral gegebenen 1-¹⁴C-Ascorbinsäure (HORNIG and HARTMAN, 1982).

Über die Verstoffwechselung von 1-¹⁴C-Ascorbinsäure bei Primaten liegen Studien über Rhesusaffen bzw andere Makaken, Marmosets und über den Menschen vor. Makaken exhalieren 2-90% der verabreichten Aktivität einer 1-¹⁴C-Ascorbinsäure in Form von ¹⁴CO₂. Die Oxi-dationsrate zu CO₂ war dabei weder durch die aufgenommene Vitamin C-Menge noch durch den Vitamin C-Status der Affen beeinflussbar (TILLOTSEN, 1978). Wurden die Tiere zuvor an die Versuchsbedingungen gewöhnt, atmeten sie nur 2 bis 5% der markierten Ascorbinsäure als ¹⁴CO₂ aus; den hohen Wert erreichten sie nur im Streßzustand. Nach intravenöser Applikation der 1-¹⁴C-Ascorbinsäure atmen Mensch und Makaken weniger als 1% der Aktivität in Form von ¹⁴CO₂ aus. Es ist denkbar, daß CO₂ oder Ascorbinsäuremetaboliten, aus denen CO₂ freigesetzt wird, während der Darmpassage entweder durch chemischen Abbau oder durch mikrobielle Zersetzung aus Ascorbinsäure entstehen (BAKER et al., 1975).

Bei Mensch (HANKES et al., 1974) und Makaken beginnt die

$^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation erst 5 Stunden nach oraler Applikation der markierten Ascorbinsäure in nennenswertem Umfang anzusteigen und erreicht erst nach 10 Stunden ein Maximum. Krallenaffen dagegen atmen schon wenige Minuten nach Aufnahme von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure $^{14}\text{CO}_2$ aus. Die Oxidation zu $^{14}\text{CO}_2$ beträgt bei dieser Spezies 2-24% der verabreichten Aktivität und hängt vom Vitamin C-Status und Streßzustand ab.

Bei marginaler Versorgung sowie unter dem Einfluß von Streß bzw. Krankheit exhalieren Krallenaffen mehr CO_2 als bei Hochversorgung und Gewöhnung an die Versuchsbedingungen (GEYER, 1987). Laut KALLNER et al. (1985) atmet der Mensch nur bei sehr hoher Vitamin C-Aufnahme 1-10% der Aktivität einer oral gegebenen markierten Ascorbinsäure als $^{14}\text{CO}_2$ aus. Dies steht im Widerspruch zu früheren Studien von ABT et al. (1963), wobei 25% einer oral verabreichten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure beim Menschen zu CO_2 oxidiert wurden. Diese hohe CO_2 -Ausscheidung konnte mit Ergebnissen von BAKER et al. (1963) geklärt werden: Wird die $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure vor der Applikation 36 bis 72 Stunden in wässriger Lösung inkubiert, so werden bis zu 30% der Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ exhaliert, bei Verabreichung sofort nach dem Auflösen der Ascorbinsäure dagegen weniger als 0,1%.

Der mit dem Urin ausgeschiedene Anteil von Ascorbinsäure und deren Metaboliten ist bei Makaken von der oral zugeführten Menge abhängig. Je höher die Zufuhr von Ascorbinsäure bei diesen Tieren ist, desto mehr Aktivität wird mit dem Urin eliminiert. Innerhalb von 24 Stunden wird ein Wert zwischen 4 und 16% erreicht. Auch bei Krallenaffen ist der Anteil der über den Urin ausgeschiedenen Ascorbinsäure und deren Metaboliten abhängig von der oralen Vitamin C-Zufuhr. Bei marginaler Vitamin C-Versorgung werden 2-9%, bei Hochversorgung dagegen bis zu 64% der

Aktivität einer 1-¹⁴C-Ascorbinsäure mit dem Harn eliminiert. Während sich bei hoher Vitamin C-Zufuhr 70% der im Urin befindlichen Aktivität als unverstoffwechselte Ascorbinsäure erweisen, lassen sich bei geringer Vitamin C-Zufuhr nur noch sehr kleine Mengen unverstoffwechselter Ascorbinsäure, ohne spezifische ¹⁴C-Aktivität darin, nachweisen. Im Kot der Tiere finden sich 2,5-22% der verabreichten Aktivität (GEYER, 1987).

Die ¹⁴C-Aktivität im Urin von Makaken kann chromatographisch aufgetrennt werden in eine Ascorbinsäure- und eine Oxalsäurefraktion sowie in zwei weitere Fraktionen, die nicht identifiziert wurden. Bei niedriger Vitamin C-Versorgung beträgt der Anteil nichtverstoffwechselter Ascorbinsäure 10-20%, bei hoher Versorgung dagegen 75% der im Urin nachgewiesenen Aktivität. Als Oxalat liegen bei Niedrigversorgung 25-48%, bei hoher Vitamin C-Aufnahme dagegen nur noch 7% der Aktivität im Urin vor (TILLOTSEN and MCGOWN, 1981). Makaken scheiden bei bedarfsdeckender Vitamin C-Zufuhr insgesamt durchschnittlich 40% der Aktivität einer oral gegebenen 1-¹⁴C-Ascorbinsäuredosis mit dem Urin aus (TILLOTSEN, 1978). Etwa die gleiche Menge (über 30% der Aktivität binnen 24 Stunden) eliminierten Rhesusaffen nach intravenöser Injektion über den Urin, davon 18-24% als unverstoffwechselte Ascorbinsäure, 18-46% als Dehydroascorbinsäure und 2,3-Diketogulonsäure sowie 20-38% als Oxalsäure (ABT et al., 1962).

Auch beim Menschen erfolgt der Großteil der Ausscheidung von Ascorbinsäure und von deren Metaboliten über die Niere. Der Schwellenwert für eine aktive und sättigbare tubuläre Rückresorption liegt zwischen 0,7 und 0,9 mg Vitamin C pro 100 ml Plasma (KALLNER et al., 1982). Von einer intravenös verabreichten Ascorbinsäure werden beim Menschen innerhalb von 10 Tagen zwischen 36% und 45% mit dem Urin eliminiert, davon 20% als unverstoffwechselte As-

corbinsäure, 20% als 2,3-Diketogulonsäure, 44% in Form von Oxalat und 2% als Dehydroascorbinsäure. Weiterhin läßt sich im Urin des Menschen Ascorbinsäuresulfat nachweisen (BAKER et al., 1971). In den Fäzes finden sich weniger als 1% einer intravenös verabreichten Aktivität (HELLMAN and BURNS, 1958).

2.6 Retention und Halbwertszeit

Zwar vermag wiederholte hohe Vitamin C-Zufuhr den Ascorbinsäurepool eines Organismus zu vergrößern, jedoch führen Sättigung des Transportmechanismus bei der Resorption im Darm, Überschreiten der Nierenschwelle durch hohe Serumascorbinsäurespiegel sowie beschleunigter Katabolismus zu einem erhöhten Umsatz des Vitamins.

Mit steigender Vitamin C-Zufuhr verkürzt sich dessen biologische Halbwertszeit. Diese beträgt beim Menschen durchschnittlich 30 Tage bei einer oralen Gabe von 30 mg Ascorbinsäure pro Tag, dagegen nur 10 Tage, wenn 180 mg Vitamin C täglich zugeführt werden. Je nach Ascorbinsäureaufnahme beträgt der gesamte Ascorbinsäurepool zwischen 10 und 20 mg/kg Körpergewicht (KALLNER et al., 1982). Beim Meerschweinchen ergibt sich nach intraperitonealer Verabreichung von 5 mg Ascorbinsäure eine biologische Halbwertszeit von durchschnittlich 4 Tagen, bei einem Ascorbinsäurepool von 54 mg/kg Körpergewicht (HORNIG and HARTMANN, 1982). Die unterschiedlichen Halbwertszeiten erklären, warum Vitamin C-freie Diät beim Meerschweinchen schon nach 20 Tagen zu Skorbutsymptomen führt, während diese beim Menschen erst nach 3 Monaten auftreten (HODGES et al., 1971). Bei Makaken beträgt der Ascorbinsäurepool 24 mg/kg Körpergewicht und die biologische Halbwertszeit 15 Tage bei einer Vitamin C-Zufuhr von 1 mg/kg Körperge-

wicht. Dagegen ergibt sich bei dieser Spezies eine Halbwertszeit von 68 Tagen, wenn täglich nur 0,5 mg Ascorbinsäure pro kg Körpergewicht verabreicht werden (TILLOTSON and O'CONNOR, 1981).

Mittels der Isotopenexkretionsmethode läßt sich nach Verabreichung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure die ^{14}C -Eliminierung und der Plasmaaktivitätsverlauf durch ein Kompartimentmodell interpretieren. Ein Kompartiment stellt als Teil des gesamten Verteilungsraums eines Stoffes im Organismus eine biokinetische Einheit dar. Diese kann mit morphologischen Strukturen (z.B. Geweben) oder anatomischen Gebilden (z.B. Organen) identisch sein. Die Halbwertszeit eines Kompartiments ergibt sich aus der Steigung der Retentionskurven einer mit einem Tracer markierten Einzeldosis dieses Stoffes (DOST, 1968). Beim Menschen (KALLNER et al., 1982) und beim Meerschweinchen (HORNIG and Hartmann, 1982) führt der nach Verabreichung von markierter Ascorbinsäure gemessene Aktivitätsverlauf im Plasma zu einer dreiphasigen Retentionskurve, was die Verteilung der Aktivität in drei Kompartimente mit entsprechend unterschiedlichen Halbwertszeiten erwarten läßt. KALLNER et al. (1982) vermuten ein zentrales Kompartiment, das zunächst die Ascorbinsäure aufnimmt und dann entweder unverändert eliminiert oder mit zwei weiteren Kompartimenten austauscht, von denen das eine als Langzeitspeicher fungiert, während das andere Ort des Vitamin C-Metabolismus ist, von dem aus die Metaboliten eliminiert werden.

Bei Makaken (TILLOTSEN and O'CONNOR, 1981) wurde die Eliminierung von Aktivität nach oraler Gabe von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure durch ein Modell mit zwei Kompartimenten beschrieben. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten der Kompartimente lassen sich bei dieser Spezies

durch induzierten Streß verkürzen bzw. durch verminderte Vitamin C-Zufuhr verlängern.

Auch bei Krallenaffen zeigen die semilogarithmisch aufgetragenen Retentionskurven einen zweiphasischen Verlauf, was die Verteilung der Aktivität auf zwei Kompartimente vermuten läßt. Ein initiales, rasch austauschendes Kompartiment (Halbwertszeit 2 - 7,5 h) soll den gesamten Verteilungsraum von Ascorbinsäure nach der Resorption aus dem Darm repräsentieren. Das zweite, sehr langsam austauschende Kompartiment (Halbwertszeit 447 - 871 h) wird als Ort des Vitamin C-Metabolismus, sowie, aufgrund seiner hohen Aktivitätsaufnahme, als Speicher der Ascorbinsäurereserven gedeutet. Marginale Vitamin C-Zufuhr führt bei diesen Tieren zu längeren Halbwertszeiten beider Kompartimente, während Streß bevorzugt die Halbwertszeit des initialen Kompartiments verkürzt (GEYER, 1987).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

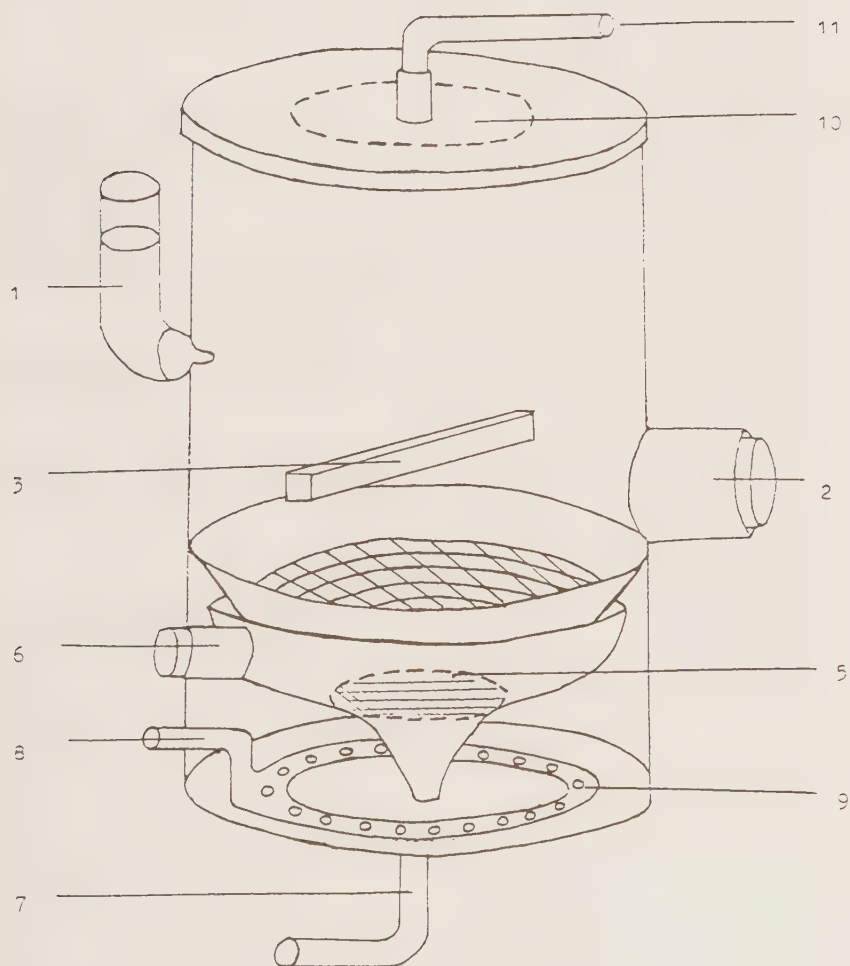
3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten drei männliche, adulte, dem Anschein nach gesunde Affen der Spezies *Callithrix jacchus*. Diese Tiere ("Detlef", zu Beginn der Untersuchungen 4 Jahre alt, 450 g KG; "Django", 5 Jahre alt, 430 g KG; "Gustav", 4 1/2 Jahre alt, 525 g KG) stammen aus der Kralenaffenkolonie des Max von Pettenkofer-Instituts unserer Universität, wo sie auch geboren wurden.

Die Tiere wurden vor und zwischen den Versuchen in einfachen Edelstahlkäfigen gehalten. Für die Messung der Atemluft, bei gleichzeitig getrennter Sammlung von Kot und Urin, wurden die Tiere in einer von GEYER (1987) entwickelten Stoffwechselkammer gehalten (Abbildung 1). Diese Kammer, ein 40 cm hoher Zylinder mit einem Durchmesser von 30 cm, besteht aus Plexiglas. Sie ist mit einer Tränkeflasche (1), einem Futterbehälter (2) und einer Sitzstange (3) versehen. Durch ein grobmaschiges Drahtnetz (4) wird der obenliegende, ca. 2 l fassende Aufenthaltsbereich des Tieres von einem darunterliegenden, trichterförmigen Auffangsystem aus Polyester getrennt. Dieses ist mit einem feinmaschigen Gitter (5) versehen, welches Fäces und Futterreste zurückhält, die über eine verschließbare Öffnung (6) mit einer langen Pinzette entnommen werden können. Der Trichter mündet über einen Schlauch (7) in eine 200 ml-Plastikflasche, in welcher sich der Urin sammelt. Luft wird durch eine unten an der Kammer befindliche

Abbildung 1: Stoffwechselkammer

(Erklärung der Ziffern siehe Text 3.1.1)



Öffnung (8) über einen Schlauch in einen Ring aus Kupfer (9) gesaugt und strömt über regelmäßig verteilte kleine Bohrungen gleichmäßig in die Kammer. Durch eine Öffnung im Deckel (10), die mit einer Prallplatte (11) versehen ist, um Toträume und axiale Strömungen zu verhindern, wird die Luft wieder abgesaugt. Die Durchströmungsrate der Kammer betrug im Versuch 54 Liter/h, die Einstellzeit wurde auf ca. eine Stunde berechnet.

Zur getrennten Sammlung von Kot und Urin, ohne Messung der Atemluft, wurden die Affen in Stoffwechselkäfigen für Marmosets (Fa. Tecniplast, Gazzada, Italien) gehalten. Die Käfige sind 37 cm breit, 39 cm tief und 51 cm hoch. Sie sind mit einer Tränkeflasche, einem Futterbehälter, einer Sitzstange und einem Schlupfkasten mit Maschendrahtboden ausgestattet. Durch den Drahtgitterboden gelangen Kot, Urin und Futterreste über eine Auffangwanne aus Polyester in ein Trennsystem. Feste und flüssige Anteile werden gesondert aufgefangen.

Die Tiere waren in einem fensterlosen, vollklimatisierten Raum bei 25° Lufttemperatur und 60% Luftfeuchte untergebracht. Die Beleuchtung mit einer Lichtintensität von 500 Lux erfolgte im 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus.

Als Futter diente den Affen eine Koloniediät in Form von Pellets mit einem Vitamin-C Gehalt von 4000 ppm. (s. Tab. 1, 2, 3) Das Futter wurde im Hause selbst hergestellt. (Rezeptur in Anlehnung an FLURER et al., 1983)

Tabelle 1

Komponenten der Koloniediät

Zusammensetzung	Anteile in %
Maisschrot	25,5
Speisehaferflocken	20,0
Weizenkleie	9,0
Saccharose	13,0
Glucose	2,0
Molkenprotein (72 % Protein in T.S.)	4,0
Sojaproteinkonzentrat (71 % Protein in T.S.)	8,0
Casein (93 % Protein in T.S.)	3,0
Fettkonzentrat (40 %, in Magermilchpulver)	6,0
Sojaöl	3,0
Vitaminvormischung (Vit.C-frei)	0,2
Bananenaroma	1,5
<u>Vitamin C</u>	0,4
Spurenelementvormischung	0,1
$\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,5
CaCO_3	1,5
NaCl	0,6
Cholinchlorid	0,2
DL-Methionin	0,1
Kalziumpropionat	0,4
Summe	100,0

Tabelle 2

Komponenten der Vitaminvormischung

Anteile in 2 Gramm Vormischung (= pro kg der fertigen Diät).

Retinol	10000	I.E.
Cholecalciferol	2000	I.E.
alpha-D,L-Tocopherolacetat	100	mg
Menadion	2	mg
Thiamin	5	mg
Riboflavin	10	mg
Pyridoxin	10	mg
Niacin	40	mg
Folsäure	4	mg
Ca-D-Pantothenat	20	mg
Cobalamin	50	/ug
Biotin	1	mg

Tabelle 3

Komponenten der Spurenelementvormischung

Anteile in 1 Gramm Vormischung (= pro kg der fertigen Diät).

Fe (Eisenfumarat)	100	mg
Mn (Mangansulfat x H ₂ O)	80	mg
Zn (Zinkacetat x 2 H ₂ O)	80	mg
Cu (Kupferacetat x H ₂ O)	12	mg
Se (Natriumselenit x 5 H ₂ O)	0,5	mg
J (Kaliumjodid)	2,5	mg
F (Natriumfluorid)	5	mg
Co (Cobaltsulfat x 7 H ₂ O)	1	mg
Mg (Magnesiumoxid)	70	mg

3.1.2 Versuchsplanung und -durchführung

Zu Untersuchungen des Vitamin C-Metabolismus der Spezies *Callithrix jacchus* mittels einer Isotopenexkretionsmethode wurde den Affen sowohl peroral als auch intravenös $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierte Ascorbinsäure verabreicht. Anschließend wurden die Tiere in der Stoffwechselkammer gehalten, wo das CO_2 der Ausatemluft adsorbiert und Kot und Urin getrennt gesammelt werden konnten. Die in diesen drei Fraktionen enthaltene $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Aktivität wurde anschließend bestimmt. Da nach 48 Stunden die Aktivität der CO_2 -Fraktion nur noch nahe der Nachweisgrenze lag, wurden die Tiere in die Stoffwechselkäfige gesetzt, um jetzt ausschließlich Kot und Urin sammeln zu können und die darin enthaltene ^{14}C -Aktivität zu bestimmen. Nach weiteren 10 Tagen wurde auch in diesen Fraktionen die Nachweisgrenze erreicht, so daß alle Versuche am 12. Tag nach Verabreichung der radioaktiven Substanz beendet werden konnten. An diesem Tag wurde den Tieren jeweils Blut entnommen, um das Blutserum auf ^{14}C -Aktivität zu untersuchen.

Neben der quantitativen Aktivitätsbestimmung in den Ausscheidungsfraktionen Kot, Urin und Atemluft wurde eine qualitative Analyse der ^{14}C -aktiven Vitamin-C-Metaboliten im Urin durchgeführt. Mittels HPLC sollten die Metaboliten aufgetrennt und identifiziert und dann anhand des Radioaktivitätsmonitors aufgrund ihrer beta-Strahlung quantitativ bestimmt werden. Die quantitative Nachweisgrenze des Radiomonitors sollte die den Tieren zu verabreichende Menge der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten Ascorbinsäure festlegen. Den Tieren wurde peroral 925 kBq ($1,2\text{ }\mu\text{mol}$), bzw. 370 kBq ($0,5\text{ }\mu\text{mol}$) intravenös, von dieser Substanz verabreicht.

Vor der Verabreichung wurde die radioaktiv markierte L-(1-¹⁴C)-Ascorbinsäure (Amersham, Braunschweig) auf radiochemische Reinheit mittels HPLC und Radiomonitor untersucht. Sie war jeweils $\geq 95\%$.

Unmittelbar vor Beginn des ersten Versuchs wurden die Affen in den Stall des Instituts für Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München in Neuherberg gebracht. Hier wurden die Tiere vor, während und zwischen den Versuchen mit der ihnen gewohnten Koloniediät mit einem Vitamin C-Gehalt von 4000 ppm gefüttert. Nach Beendigung eines Versuchs erhielten die Tiere eine mit Vitamin C angereicherte 10%-ige Glucoselösung zum "Auswaschen" der im Körper verbliebenen radioaktiven Substanz.

Versuchsbeginn war jeweils 3 Stunden nach Beginn des "Lichttages", also um 10⁰⁰ MEZ. Kurz vor der Verabreichung wurde die markierte Ascorbinsäure in 5 ml 10%-iger Glucoselösung (bei peroraler Gabe) bzw. in 2 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung (bei intravenöser Gabe) aufgelöst und dann die benötigte Aktivitätsmenge in eine Einwegspritze aufgezogen. Diese Lösung wurde den Affen je nach Versuch entweder intravenös in die Vena femoralis oder peroral durch Aufträufeln auf die Zunge verabreicht.

Insgesamt wurden 7 Versuche durchgeführt. Die Affen Django und Detlef wurden in je 3 Versuchen unter ähnlichen Bedingungen gehalten. Ihnen wurde zunächst 925 kBq 1-¹⁴C-Ascorbinsäure peroral gegeben unter nachfolgender psychischer Belastung (Detlef) bzw. ohne Gewöhnung an die Versuchsbedingungen (Django). Später erhielten sie 925 kBq peroral ohne zusätzliche Belastung, und schließlich 370 kBq intravenös, ebenfalls ohne zusätzliche Belastung. In einem weiteren Versuch wurden Gustav 925 kBq peroral verabreicht. Dieser Affe wurde nur jeweils

kurzfristig "gestreßt".

In den Versuchen mit zusätzlicher Belastung sollte der Einfluss von Streß auf den Vitamin C-Metabolismus untersucht werden. Durch die intravenöse Verabreichung sollte ein möglicher Einfluss des Verdauungstraktes auf den Vitamin C-Metabolismus ausgeschlossen werden.

Vor den "streßfreien" Versuchen wurden die Affen an die Versuchsbedingungen gewöhnt, indem sie eine Woche vor Versuchsbeginn zunächst kurzzeitig, dann über einen immer längeren Zeitraum, in die Stoffwechselkammer gesetzt wurden. In den Versuchen mit psychischer Belastung wurden die Tiere permanent (Detlef) bzw. sporadisch (Gustav) ungewohnten akustischen und optischen Reizen während der ersten 8 Stunden ab Versuchsbeginn ausgesetzt. Der optische Reiz bestand in der Erzeugung von Lichtblitzen in der Neonbeleuchtung des Raumes durch Betätigung der Lichtschalter. Der akustische Reiz wurde durch den Motorenlärm einer auf der Stoffwechselkammer platzierten Vacuumpumpe erzeugt. Zusätzlich wurden die Tiere mit einer Pinzette immer wieder von der Sitzstange verdrängt. Der Affe Django mußte dagegen in seinem Streßversuch keinen solchen Reizen ausgesetzt werden. Das Tier wurde unmittelbar nach dem Transport in die Stoffwechselkammer gesetzt und war bereits durch die ihm ungewohnten Versuchsbedingungen ausreichend beunruhigt. Dies zeigte sich, ebenso wie bei den anderen Tieren im Streßversuch, an einem erheblich dünneren Kot.

Alle Versuche wurden unter der Vitamin C-Hochversorgung von 4 g/kg Koloniediät durchgeführt. Der Vitamin C-Bedarf der Weißbüschelaffen ist ab einer Versorgung von 0,5 g/kg Futter sicher abgedeckt (KERN, 1986). Diese Überversorgung sollte eine hohe Wiederfindung der verabreichten Aktivität garantieren und die qualitative und quantitative Bestimmung der Vitamin C-Metaboliten im Urin erleichtern.

Tabelle 4: Übersicht Versuchsplanung

<u>Versuch</u>	I	II	III	IV	V	VI	VII
<u>Affe</u>	<u>Django</u>	<u>Django</u>	<u>Django</u>	<u>Detlef</u>	<u>Detlef</u>	<u>Detlef</u>	<u>Gustav</u>
<u>verabreichte</u>							
<u>Aktivität</u>	925 KBq	925 KBq	370 KBq	925 KBq	925 KBq	370 KBq	925 KBq
<u>Verabreichungs-</u>							
<u>form</u>	p.os	p.os	i.v.	p.os	p.os	i.v.	p.os.
<u>zusätzliche</u>							
<u>Belastung</u>	+ ¹	-	-	+	-	-	+ ²

Diät: 4000 ppm Vitamin C

Versuchsdauer: 12 Tage

Stoffwechselkammer: 2 Tage (¹⁴C-Messung in Kot, Urin, Atemluft;

Metabolitenbestimmung im Urin)

Stoffwechselkäfig: 10 Tage (Aktivitätsmessung in Kot, Urin;

Metabolitenbestimmung im Urin)

+¹= nicht an die Versuchsbedingungen gewöhnt

+²= Belastung nur kurzfristig in bestimmten Zeitabständen

3.1.3 Probengewinnung und -aufbewahrung

3.1.3.1 Harnproben

In regelmäßigen Abständen wurde der Aufenthaltsbereich des Affen mit destilliertem Wasser und das Auffang-/Trennsystem mit 5 prozentiger Metaphosphorsäure (Merck, Darmstadt) mittels einer Spritzflasche gespült. Der nur tröpfchenweise abgesetzte Harn der Tiere sollte somit möglichst vollständig erfaßt und zum Abfluß gebracht werden. Der verdünnte Harn wurde unverzüglich bis zur weiteren Analyse bei -73°C tiefgefroren.

3.1.3.2 Kotproben

Kot wurde jeweils vor der Harnprobengewinnung eingesammelt, um eine Kontamination mit der Spülflüssigkeit zu verhindern. In den Versuchen mit den Affen Detlef und Gustav erfolgte die Entnahme der Fäzes unmittelbar nach dem Kotabsatz, um auch die Kontamination mit ^{14}C -haltigem Urin zu minimieren. Nach der Entnahme wurde der Kot sofort bis zur weiteren Untersuchung bei -73°C tiefgefroren.

3.1.3.3 CO_2 -Adsorption aus der Atemluft

Das in der Expirationsluft enthaltene Kohlendioxid wurde nach einer von BAGGIOLINI (1965) beschriebenen Methode adsorbiert. Die aus der Stoffwechselkammer kontinuierlich abgesaugte Luft wurde, nachdem die darin enthaltene Aktivität während der ersten 8 Stunden durch einen

modifizierten Tritiummonitor gemessen worden war (siehe 3.1.4.3), durch zwei Gaswaschflaschen gepumpt, die je 140 ml Ethanolamin und 60 ml Methylcellosolve enthielten. Ethanolamin (Merck, Darmstadt) diente als CO₂-Adsorbens, Methylcellosolve (Merck, Darmstadt) als Lösungsvermittler zwischen dem Ethanolamin und der später zugegebenen Szintillatorflüssigkeit. In regelmäßigen Abständen wurde dieses Flüssigkeitsgemisch erneuert und die so gewonnenen Proben bei -73°C bis zur weiteren Aufbereitung tiefgefroren.

3.1.3.4 Blutproben

Am jeweils letzten Versuchstag wurden die Tiere morgens eingefangen und ohne Sedierung fixiert, um 1,5 ml Blut aus der Vena femoralis zu entnehmen. Das Blut wurde zur Serumgewinnung in Qualicups (Zinser, Frankfurt) gefüllt und bei 3000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 3200). Das Serum wurde abpipettiert und bis zur Aktivitätsbestimmung bei -73°C tiefgefroren. Bei der Berechnung der Gesamtaktivität im Serum der Tiere wurde bei einer Blutmenge von 7% des Körpergewichts von einem durchschnittlichen Hämatokrit von 43,1% für gesunde adulte Marmosets (MCNEES et al., 1982) ausgegangen.

3.1.4 Analytische und radiometrische Methoden

3.1.4.1 Vitamin C-Metabolitenbestimmung im Harn

Das Ziel war, die ¹⁴C-haltigen Hauptmetaboliten der Ascorbinsäure im Urin aufzutrennen, zu identifizieren und

quantitativ zu bestimmen. Es galt die Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, 2,3-Diketogulonsäure und die Oxalsäure möglichst in einem Arbeitsgang, bei einer Nachweisgrenze von unter 1 ng/ml, nachzuweisen. Aufgrund dieser gewünschten Anforderungen bot sich die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) als Trennverfahren an.

Das benutzte HPLC-System (WATERS ASS., Eschborn) bestand aus einer Pumpe (chromatography pump, Modell 6000A), einem UV-Festwellendetektor für 214 nm (Millipore extended wavelength module) und einem Einspritzsystem (Modell U6K). Als Trennsäule wurde eine "reversed phase LiChrosorb^R RP 18" (Merck, Darmstadt) in den Maßen 250 x 10 mm bei einer Teilchengröße der Säulenfüllung von 10 μ m gewählt.

Zur verwendeten Säule und den aufzutrennenden Säuren mußte ein passender Eluent gefunden werden. Da bei der "reversed phase chromatography" die zu trennenden Substanzen nur in ungeladenem Zustand hinreichend retardiert werden, mußte der pH-Wert des Eluenten so niedrig gewählt werden, daß die zu erwartenden Säuren, vor allem die Oxalsäure, weitgehend undissoziiert vorlagen. Carbonsäuren (Essigsäure, Ameisensäure) schieden als Eluenten aus, da sie im Photometer bei 214 nm Wellenlänge selbst zu starke Absorption aufwiesen.

Auch halogenhaltige Säuren (HCl) konnten nicht eingesetzt werden, um Korrosionsschäden an den Edelstahlteilen der Anlage zu vermeiden. Alkohole, selbst Methanol, erwiesen sich als zu unpolar, um eine Auftrennung zu ermöglichen. Die Retention der aufzutrennenden Säuren war dabei gering. Verdünnte Phosphorsäure (0,01 M, Serva, Heidelberg) erwies sich schließlich als geeigneter Eluent.

Mittels Standards wurden die Retentionszeiten der einzelnen Säuren bestimmt. L-Ascorbinsäure (Sigma, Taufkirchen), Oxalsäure (Sigma, Taufkirchen) und Dehydro-

ascorbinsäure (Serva, Heidelberg) standen zur Verfügung, die 2,3-Diketogulonsäure wurde nach einem von DONNER und HICKS (1981) beschriebenen Verfahren selbst hergestellt. Dazu wurde ein Gramm Ascorbinsäure in 45 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 1,2 Gramm Aktivkohle wurde durch die Suspension 5 Stunden lang bei Raumtemperatur Luft geleitet. Danach wurde die Aktivkohle abfiltriert und die gewonnene klare, farblose Lösung von Dehydroascorbinsäure im Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend mit ca. 6 ml 0,5 N NaOH zur Ketogulonsäure hydrolysiert. Dabei färbte sich die Lösung zunehmend gelb bis braun.

In dieser Lösung wurden mittels HPLC zwei Substanzen differenziert, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die Diketogulonsäure und die Threonsäure handelt. Eine Identifizierung mittels Standards war nicht möglich, da authentische Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung standen. Bei der Substanz mit der kürzeren Retentionszeit ($\emptyset$ RT = 7,7 min), die bei vorsichtiger Hydrolyse zunächst allein auftrat, sollte es sich aufgrund theoretischer Überlegungen um die Diketogulonsäure handeln (Abbildung 2, Peak I). Mit weiterer Steigerung des pH-Werts trat die Substanz mit der längeren Retentionszeit (RT = $\emptyset$ 8,3 min) in zunehmender Menge auf. Es handelte sich hierbei vermutlich um die aus der Diketogulonsäure durch Abspaltung von Oxalsäure entstandene Threonsäure (Abbildung 2, Peak II). Eine Identifizierung der Diketogulonsäure und der Threonsäure wäre möglich gewesen durch Einsatz von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure im in vitro-Versuch. Da diese beiden Komponenten bei den in vivo-Versuchen nicht nachzuweisen waren, wurde auf die endgültige Identifizierung verzichtet. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 4 ml/min und einem Druck von 1000 psi betrugen die durchschnittlichen Retentionszeiten für die Oxalsäure 3,9 Minuten, für die Dehydroascorbinsäure 4,8 Minuten und für die Ascorbinsäure

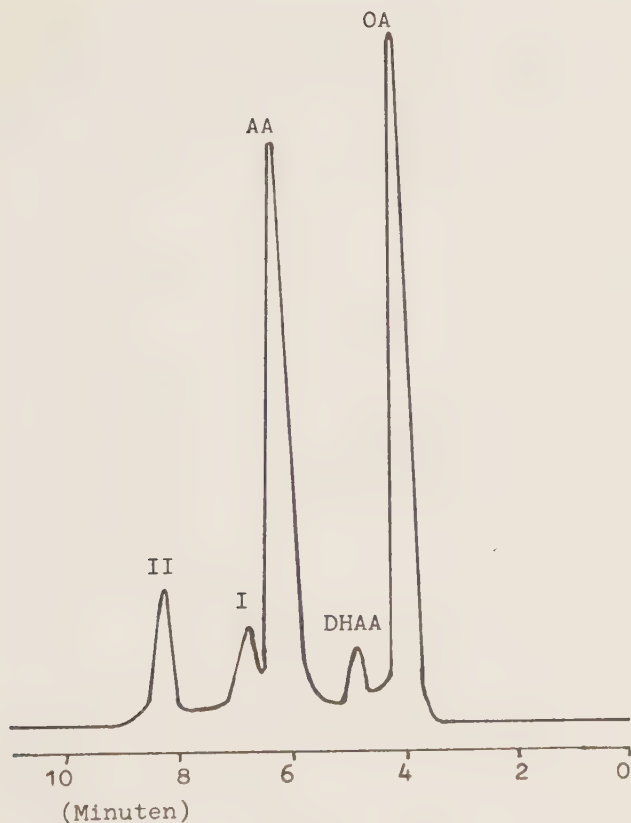


Abbildung 2: High-performance liquid chromatogram

Trennsäule: reversed phase (Lichrosorb RP 18)
250 x 10 mm

Teilchengröße: 10 μ m

Eluent: 0,01 M H_3PO_4

Fließgeschwindigkeit: 4 ml/min

Oxalsäure (OA), Dehydroascorbinsäure (DHAA), Ascorbinsäure (AA), Peak I und Peak II siehe Text (3.1.4.1).

6,2 Minuten (Abbildung 2).

Zur Analyse wurden die Urinproben aufgetaut und 1 Minute lang gerüttelt. Ein Aliquot von 2 ml wurde mittels einer Einwegspritze entnommen und in ein Qualicup (Zinser, Frankfurt) filtriert (Millex-GS, MILLIPORE S.A., Molsheim, France). Von dieser Probe wurden zwischen 100 und 400 μ l in das System eingespritzt.

3.1.4.2 Bestimmung der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Aktivität der Vitamin C-Metaboliten im Harn

Zur Messung der Radioaktivität im Durchflußverfahren der durch die Säule aufgetrennten und im UV-detektor identifizierten Vitamin C-Metaboliten diente der Radioaktivitätsmonitor LB 505 (BERTHOLD, Wildbad).

In ihm können wahlweise Feststoffzellen (heterogenes System) oder Zumischzellen (homogenes System) mit verschiedenen Meßvolumina eingesetzt werden. Gewählt wurde eine Feststoffzelle mit Glasszintillator.

Bei dieser "G -Zelle" treten "Memory-Effekte" selten auf. Die Verträglichkeit für alle Eluenten, auch Säuren, ist gut, eventuelle Kontaminationen lassen sich mit geeigneten Lösungsmitteln leicht beseitigen und es werden Ausbeuten von über 85 % für ^{14}C in Aussicht gestellt. Um die Kontaminationsmöglichkeit zu mindern, wurde vor Beginn der Analysen die Meßzelle mit inaktiver Substanz (L-Ascorbinsäure, Sigma, Taufkirchen) gesättigt.

Die Auftrennung durch HPLC samt Messung im UV-Detektor und die Messung der β -Strahlung im Radioaktivitätsmonitor wurden mittels eines 2-Kanal-Potentiometerschreibers (METRAWATT GMBH, Nürnberg) simultan aufgezeichnet.

3.1.4.3 Bestimmung der Gesamtaktivität im Urin

Da die ^{14}C -Aktivität im Urin mit dem Radiomonitor nur während der ersten 5 Tage nach Versuchsbeginn nachweisbar war, wurde zusätzlich über den gesamten Versuchszeitraum eine Aktivitätsmessung im Flüssigszintillationszähler (Betaszint, Modell 5003A) durchgeführt. Je 1 ml der aufgetauten Urinproben wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasol, Du Pont) versetzt und gemessen. Mit Hilfe einer ^{14}C -Standardlösung wurde versucht, eine Quenchkurve zu erstellen. Es ergab sich bei den Urinproben in einem breiten Konzentrationsbereich eine konstante Zählausbeute von 83.2 % ($\pm 1,5\%$). Eine individuelle Quenchkorrektur der einzelnen Proben war deshalb nicht nötig. Anhand der Zählausbeute konnte unter Berücksichtigung des Nulleffekts die Zählrate errechnet werden.

3.1.4.4 Bestimmung der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Atemluft

Zur Messung der Aktivität in der Atemluft wurden teilweise zwei voneinander unabhängige Methoden angewandt.

Gleichzeitig mit der CO_2 -Adsorption (siehe 3.1.3.3.) wurde während der ersten 8 Stunden ab Versuchsbeginn die Aktivität der Atemluft in einem zur ^{14}C -Messung modifizierten, kontinuierlichen Tritium-Monitor (LB 106 K, BERTHOLD, Wildbad) gemessen. Die aus der Stoffwechselkammer abgesaugte Expirationsluft wurde mittels einer Kühlfalle vom Wasserdampf befreit, im Monitor staubgefiltert und in einer Mischkammer mit Methan als Zählgas versetzt (Mischungsverhältnis Methan:Luft 1:2).

Ein Schreiber zeichnete kontinuierlich die pro 200 Sekunden im Durchflusszählrohr gemessene Impulsrate auf.

Da die Zählrate dieser ^{14}C -Messung nur 12,5 % der Zer-

fallsrate betrug, reichte die Meßgenauigkeit nur für vergleichsweise hohe Mengen an ^{14}C -Aktivität in der Luft. Daher wurde mit Hilfe dieses Monitors der zeitliche Verlauf der ^{14}C -Exhalation nur in den ersten 8 Stunden erfaßt. Die bei der insgesamt 48 Stunden durchgeführten CO_2 -Adsorption gewonnenen Proben wurden aufgetaut, je ein ml Probenflüssigkeit wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasol, Du Pont) gemischt und im Flüssigszintillationszähler (Betaszint, Modell 5003A) gemessen. Die Zählausbeute, bestimmt mit Hilfe eines internen Standards (Beckman Instruments, Fullerton), betrug im Mittel 83,3 %. Mittels Zählausbeute, unter Berücksichtigung des Nulleffekts, wurde aus der Zählrate die Zerfallsrate berechnet.

3.1.4.5 Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in Kot und Blutserum

Die Kotproben wurden 72 Stunden lyophilisiert, dann gewogen und pulverisiert. Pro Kot- bzw. Serumprobe wurden je 2 Aliquote von 100 mg in einem Sample Oxidizer (Tri-Carb^R sample oxidizer, Modell 3385, Packard) vollständig verbrannt, das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ adsorbiert (7 ml Carbo-Sorb^R, Packard) und nach Zusatz von Szintillatorflüssigkeit (12 ml Permafluor^R, Packard) im Flüssigszintillationszähler gemessen. Mittels Verbrennung von ^{14}C -Standards bekannter Aktivität konnte die Zählausbeute bestimmt werden. Unter Berücksichtigung des Nulleffekts wurde daraus die Zerfallsrate errechnet.

3.2 ERGEBNISSE

Im ersten Versuch wurde der Affe Django bewußt einer psychischen Belastung ausgesetzt: Ohne die Versuchsbedingungen zu kennen, wurde das Tier unmittelbar nach dem Transport aus dem Tierstall in den Versuchsraum, und nach peroraler Verabreichung der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure, in die Stoffwechselkammer gesetzt.

"Django" gewöhnte sich dem Anschein nach nur langsam an die neue Umgebung und die räumliche Einengung in der Stoffwechselkammer. Der Affe verweigerte die Nahrungsaufnahme, bis er nach 2 Tagen in den Stoffwechselkäfig umgesetzt wurde. Der Kot war in den ersten 48 Stunden dickbreiig. Das Tier war besonders zu Versuchsbeginn unruhig. Innerhalb von 12 Versuchstagen wurden durch Kot, Urin und Atemluft 91,1% der verabreichten Aktivität wiedergefunden. Tabelle 5 zeigt den jeweiligen Anteil an der Gesamtexkretion in den drei Ausscheidungsfraktionen. In Abbildung 3 ist der zeitliche Verlauf der Exkretion kumulativ aufgetragen. Hauptausscheidungsweg war die Atemluft, über die 50,4% der applizierten Aktivitätsmenge in Form von $^{14}\text{CO}_2$ exhaliert wurden. Schon wenige Minuten nach Versuchsbeginn konnte Aktivität in der Atemluft nachgewiesen werden. Die Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ erreichte nach etwa einer Stunde ein Maximum. Nach 3 Stunden waren bereits über 40%, nach 24 Stunden insgesamt 49% der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ oxidiert. Im Urin erschienen 30,4% der verabreichten Aktivität. Hier erreichte die ^{14}C -Exkretion nach 6 Stunden das Maximum. Mittels HPLC konnten 3 Metaboliten der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure im Urin aufgetrennt und aufgrund ihrer Radioaktivität quantitativ bestimmt werden. Anhand ihrer Retentionszeiten wurden die

Oxalsäure, die Dehydroascorbinsäure und die Ascorbinsäure nachgewiesen (Abbildung 4). Als Oxalsäure erschienen durchschnittlich 37% der im Urin befindlichen Aktivität. Der prozentuale Anteil der Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure an der ^{14}C -Exkretion unterlag Schwankungen. Beide Metaboliten zusammen ergaben jedoch einen konstanten Anteil von im Mittel 63% der im Urin gemessenen Aktivität. Nicht nachgewiesen werden konnte die 2,3-Diketogulonsäure. Im Kot wurden 10,3% der verabreichten Aktivität gemessen, davon mehr als ein Drittel in den ersten 8 Stunden. Bis zur 56. Stunde stieg der Anteil der ^{14}C -Elimination über den Kot noch auf 8,7%. Ab diesem Zeitpunkt konnten nur noch geringe Aktivitätsmengen in den Kotproben nachgewiesen werden. Die Messung des Serums zum Versuchsende ergab, umgerechnet auf das Gesamtserum des Tieres, einen ^{14}C -Gehalt von 0,2% der verabreichten Aktivität.

Tabelle 5: Versuch I: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer oral verabreichten 1- ^{14}C -Ascorbinsäure bei "Django", ohne Gewöhnung an die Versuchsbedingungen.

Meßzeit- raum (h nach Appl.)	Atemluft		Urin		Kot	
	%	kBq	%	kBq	%	kBq
0-1	18,9	174,8	2,2	20,6	0,1	0,1
1-2	18,5	171,2				
2-3	4,8	44,4				
3-4	3,3	30,5	5,4	49,8	1,1	10,8
4-6	1,4	12,9				
6-8	0,8	7,4				
8-24	1,3	12,4	6,4	59,4	2,3	21,2
24-32	1,0	9,5				
32-48	0,4	3,7				
48-56			4,5	41,2	2,0	18,6
56-80			2,6	24,8	0,3	3,5
80-104			2,2	19,9	0,2	1,3
104-176			3,5	33,0	0,7	6,0
176-200			0,7	5,7	0,1	1,3
200-224			0,4	4,2	0,1	1,3
224-248			0,3	3,1	0,1	0,7
248-272			0,1	0,5	0,1	1,0
Summe	50,4	466,8	30,4	281,3	10,3	95,3



Abbildung 3: Versuch I: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verabreichten Aktivität einer oral gegebenen ^{14}C -Ascorbinsäure in % bzw. kBq ohne Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bei "Django".

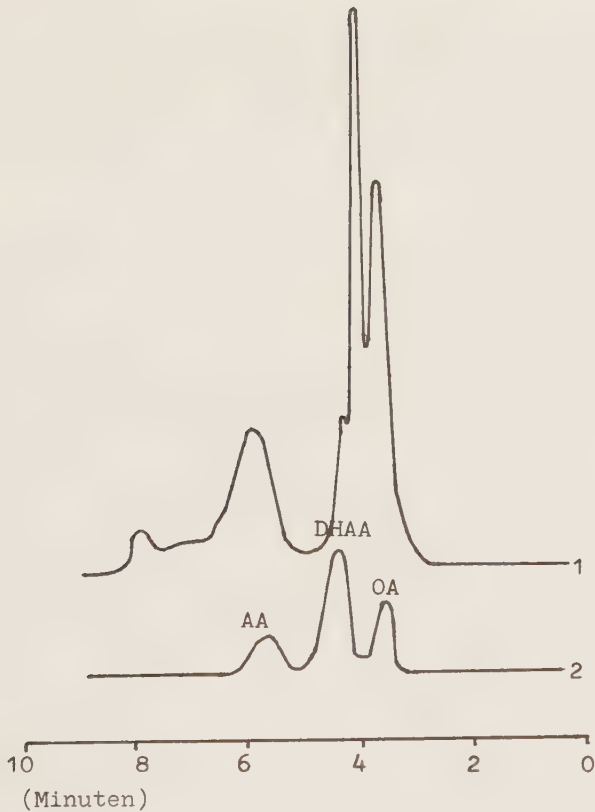


Abbildung 4: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Ascorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 24-32 Stunden nach Applikation von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Django" in Versuch I (Chromatogrammdaten siehe Abb. 3).

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Im zweiten Versuch war "Django" bereits an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Daher war der mögliche Einfluss von Streß auf den Vitamin C-Metabolismus, der von den ungewohnten Versuchsbedingungen ausging, weitgehend reduziert. Dem Tier wurden wieder 925 kBq der 1-¹⁴C-Ascorbinsäure peroral verabreicht.

Insgesamt wurden während des Versuchzeitraums 90,5% der applizierten ¹⁴C-Aktivität über Urin, Atemluft und Kot eliminiert. In Abbildung 5 ist der zeitliche Verlauf der Exkretion, kumulativ aufgetragen, dargestellt. In Tabelle 6 sind die in den jeweiligen Zeitabschnitten gemessenen Anteile der verabreichten Aktivitätsmenge in Urin, Atemluft und Kot wiedergegeben. Die Exkretion der ¹⁴C-Aktivität durch den Urin nahm in diesem Versuch mit 72,2% der verabreichten Aktivität den größten Anteil ein. Als Metaboliten der 1-¹⁴C-Ascorbinsäure erschienen von der im Urin gemessenen Aktivität durchschnittlich 28% als Oxalsäure und insgesamt 72% als Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure (Abbildung 6).

Zu ¹⁴CO₂ wurden 13,3% der applizierten markierten Ascorbinsäure oxidiert. Ein deutlich ausgeprägtes Maximum der ¹⁴C-Exhalation wie in Versuch I fehlte. Am zweiten Versuchstag konnten nur noch geringe Aktivitätsmengen in der Atemluft nachgewiesen werden. Der Kot enthielt 5% der aufgenommenen Aktivität. Nach 32 Stunden war davon bereits über die Hälfte eliminiert. Im Serum wurde am letzten Versuchstag, bezogen auf das Gesamtserum, ein Anteil von 0,15% der verabreichten Aktivität gemessen.

Tabelle 6: Versuch II: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer oral verabreichten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Asorbinsäure bei "Django", mit Gewöhnung an die Versuchsbedingungen.

Meßzeit- raum (h nach Appl.)	Atemluft % kBq	Urin % kBq	Kot % kBq
0-1	0,7 7,4	17,4 160,6	0,1 0,5
1-2	1,5 13,0		
2-3	2,8 25,5		
3-4	1,9 17,0	9,0 83,6	0,8 7,7
4-6	2,8 27,0		
6-8	1,9 17,4		
8-24	1,1 11,1	14,8 137,7	1,6 14,8
24-32	0,4 2,3		
32-48	0,2 2,2		
32-56		6,6 60,6	0,3 3,0
56-80		5,2 47,0	0,5 4,0
80-104		4,2 39,2	0,2 1,9
104-176		5,5 51,1	0,5 4,8
176-200		1,8 17,0	0,1 1,1
200-224		1,3 11,5	0,1 1,4
224-248		1,2 10,7	0,1 0,5
248-272		0,7 7,5	0,1 1,1
Summe	13,3 122,9	72,2 668,3	5,0 46,3

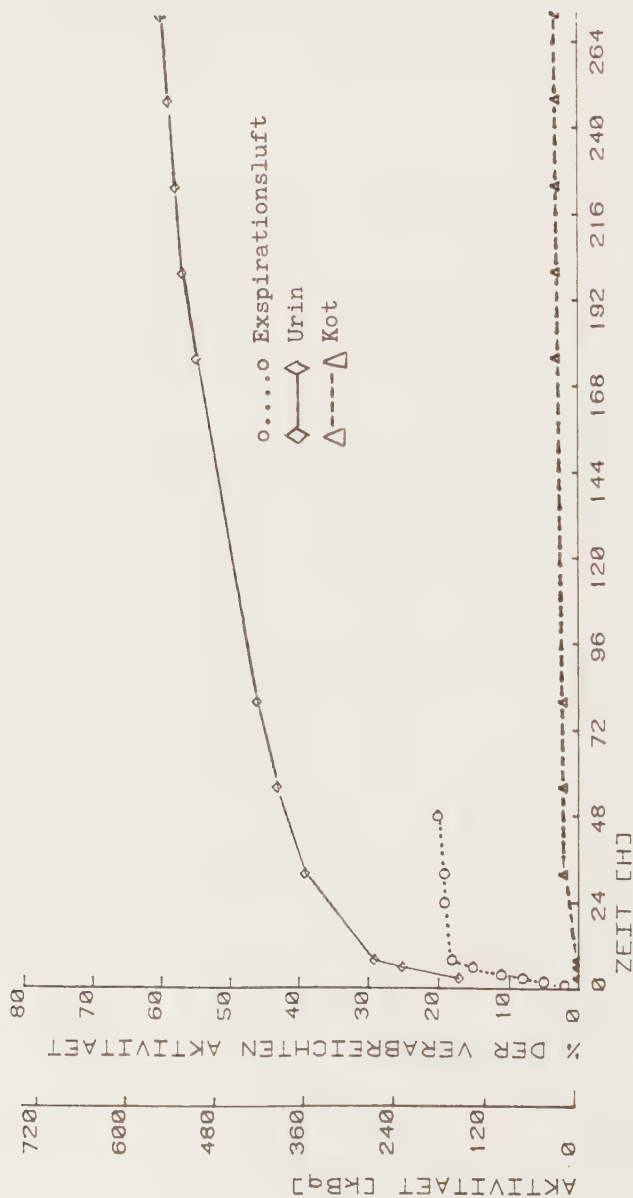


Abbildung 5: Versuch II: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verabreichten Aktivität einer oral gegebenen ^{14}C -Ascorbinsäure in % bzw. kBq mit Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bei "Django".

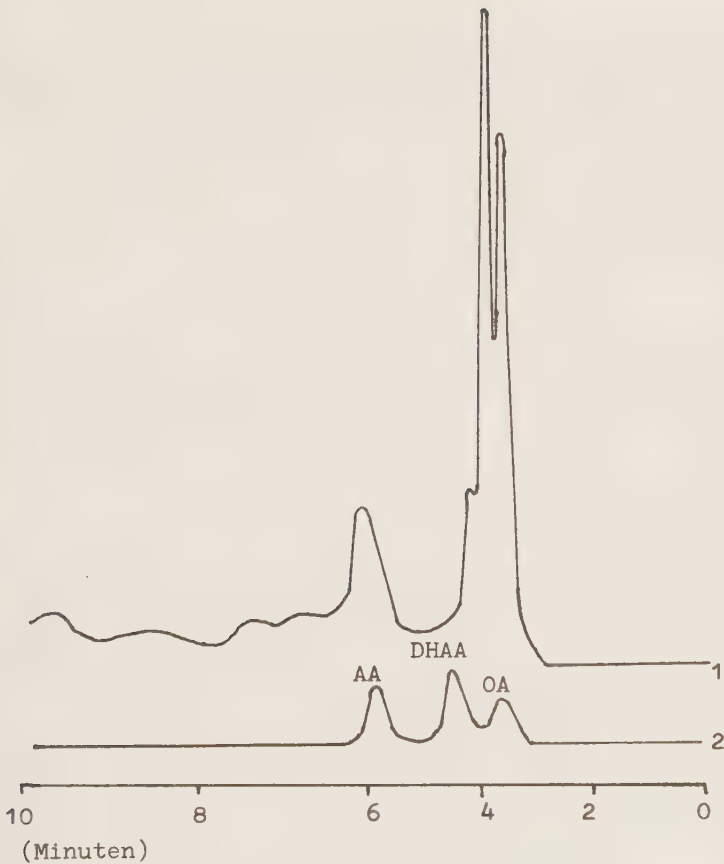


Abbildung 6: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Ascorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 0-3 Stunden nach Applikation einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Django" in Versuch II (Chromatogrammdaten siehe Abb.3).

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Im dritten Versuch wurde demselben Affen 370 kBq $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure intravenös verabreicht. Es wurde angestrebt, die Oxidation der markierten Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ näher zu lokalisieren, insbesondere festzustellen, ob es vor, nach, oder unabhängig vom Zeitpunkt der Resorption der verabreichten Ascorbinsäure zur Exhalation des radioaktiven Kohlendioxids kommt. Django war an die Versuchsbedingungen gewöhnt.

In den 3 Ausscheidungsfraktionen wurden 90,8% der verabreichten Aktivität wiedergefunden. Aus Abbildung 7 ist der zeitliche Verlauf der Exkretion, kumulativ aufgetragen, zu ersehen. In Tabelle 7 sind die in den jeweiligen Zeitabschnitten ausgeschiedenen Anteile in Urin, Atemluft und Kot angegeben.

Die Ausscheidung über den Urin mit 79,9% der verabreichten Aktivitätsmenge erwies sich als Hauptexkretionsweg. Von dieser im Urin befindlichen Aktivität erschienen durchschnittlich 17% als Oxalsäure und zusammengekommen 83% als Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure (Abbildung 8). Als $^{14}\text{CO}_2$ wurden 6,7% der applizierten Aktivitätsmenge exhaliert. Die Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ über die Atemluft erfolgte zum größten Teil gleichmäßig verteilt über die ersten 8 Stunden. Die Messung des Kots ergab einen ^{14}C -Gehalt von 4,2% der verabreichten Aktivität, davon mehr als ein Drittel in den ersten 8 Stunden. Im Serum des Tieres verblieben 0,2% der applizierten Aktivität.

Tabelle 7: Versuch III: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer intravenös verabreichten 1- ^{14}C -Ascorbinsäure bei "Django".

Meßzeit- raum (h nach Appl.)	Atemluft % kBq	Urin % kBq	Kot % kBq
0-1	0,3 1,3	21,8 80,5	0,1 0,3
1-2	1,0 3,5		
2-3	1,0 3,8		
3-4	0,8 3,1	10,0 36,8	1,6 5,6
4-6	0,9 3,3		
6-8	0,7 2,4		
8-24	1,1 4,2	20,8 77,0	0,5 1,8
24-32	0,6 2,2		
32-48	0,3 1,2		
48-56		8,8 33,2	0,9 3,0
56-80		7,3 26,6	0,4 1,5
80-104		4,5 16,3	0,3 1,1
104-176		3,3 12,0	0,3 1,4
176-200		0,2	0,4
200-224			0,3
224-248			0,1
248-272			0,1
Summe	6,7 25,0	79,9 296,0	4,2 15,3

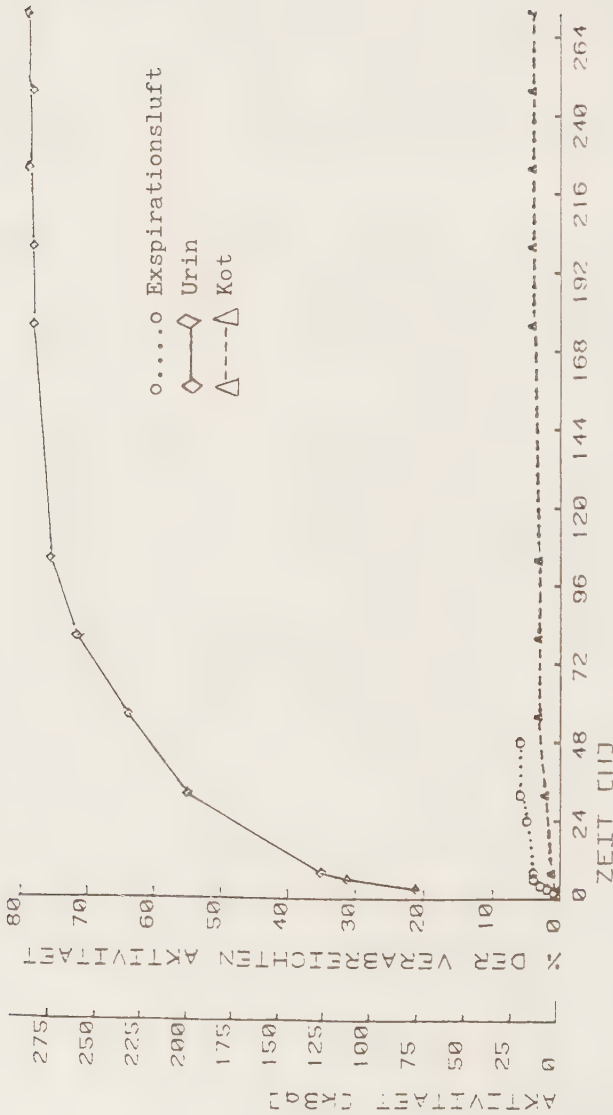


Abbildung 7: Versuch III: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verabreichten Aktivität einer intravenös gegebenen $1-^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure in % bzw. kBq nach Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bei "Django".

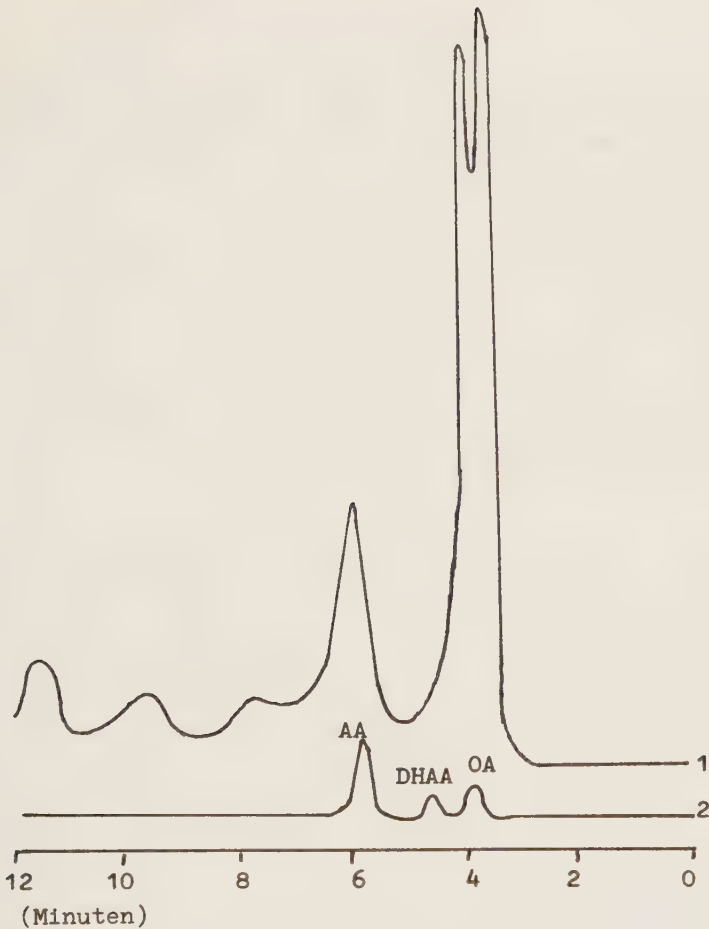


Abbildung 8: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Ascorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 24-32 Stunden nach Verabreichung einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Django" in Versuch III (Chromatogrammdaten siehe Abb.3).

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Im vierten Versuch wurde der Affe Detlef nach Verabreichung von 925 kBq $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure einer psychischen Belastung ausgesetzt. Es herrschten somit ähnliche Bedingungen wie in Versuch I mit "Django". Da jedoch "Detlef" mit dem Versuchsraum und einem Teil der Versuchsbedingungen bereits vertraut war, wurde das Tier zusätzlich ungewohnten akustischen und optischen Reizen während der ersten 8 Stunden ab Versuchsbeginn ausgesetzt. Während in den bisherigen Versuchen Kot und Urin zu festen Zeitpunkten gemeinsam entnommen wurden, erfolgte ab diesem Versuch die Kotentnahme jeweils unmittelbar nach dem Kotabsatz, um eine Kontamination der Fäces mit ^{14}C -haltigem Urin möglichst zu vermeiden.

"Detlef" war während dieses Zeitraums mit zusätzlicher Belastung sichtlich irritiert. Er verweigerte die Nahrungsaufnahme und setzte breiigen Kot ab. In Urin, Atemluft und Kot wurden zusammen 84,3% der verabreichten Aktivität gemessen. Der zeitliche Verlauf der ^{14}C -Elimination über die drei Ausscheidungswege ist in Abbildung 9 kumulativ aufgetragen. Deren jeweiliger Anteil an der Exkretion der applizierten Aktivitätsmenge pro Meßzeitraum ist aus Tabelle 8 zu ersehen. Allein mit dem Urin wurden 60,6% des Tracers innerhalb von 12 Versuchstagen eliminiert. Im Mittel 34% der ^{14}C -Aktivität wurden als Oxalsäure und zusammen 66% als Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure identifiziert (Abbildung 10).

Als $^{14}\text{CO}_2$ wurden 20,1% des Tracers exhaliiert, mit einem wenig markanten Maximum in der dritten Stunde. Am zweiten Versuchstag wurden nur noch 0,5% der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ oxidiert. In den Fäzes wurden 3,6 % der applizierten ^{14}C -Aktivität gemessen. Der Hauptteil der mit dem Kot eliminierten Aktivität wurde wiederum in den ersten 32 Stunden ermittelt. Die Messung des Serums ergab, bezogen auf das Gesamtserum des Affen, einen ^{14}C -Gehalt von 0,3% der verabreichten Aktivität.

Tabelle 8: Versuch IV: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer oral verabreichten 1- ^{14}C -Ascorbinsäure bei "Detlef", mit zusätzlicher Belastung des Tieres.

Meßzeit- raum (h nach Appl.)	Atemluft		Urin		Kot	
	%	kBq	%	kBq	%	kBq
0-1	2,6	24,4	17,7	165,7	0,1	0,9
1-2	2,9	27,7				
2-3	3,3	31,0				
3-4	2,8	25,6	7,1	65,5	0,4	3,5
4-6	3,6	33,6				
6-8	2,8	25,0				
8-24	1,6	14,6	10,3	95,7	1,2	11,1
24-32	0,3	2,8				
32-48	0,2	1,3				
48-56			4,1	37,6	0,4	3,9
56-80			3,3	30,1	0,1	1,1
80-104			1,1	10,2	0,2	2,1
104-176			8,1	73,8	0,6	4,7
176-200			2,1	19,2	0,1	1,5
200-224			1,0	8,9	0,1	0,5
224-248			1,0	8,6	0,1	0,4
248-272			0,8	7,4		0,2
Summe	20,1	186,0	60,6	559,3	3,6	32,8

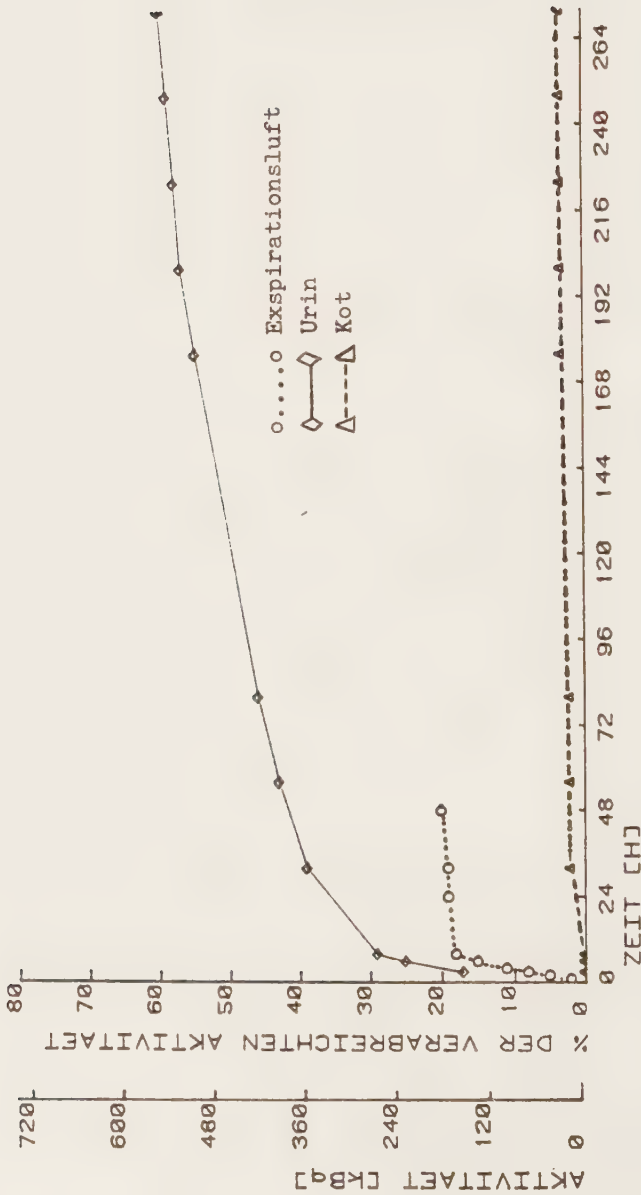


Abbildung 9: Versuch IV: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verabreichten Aktivität einer oral gegebenen $1-^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure in % bzw. KBq mit zusätzlicher Belastung bei "Detlef".

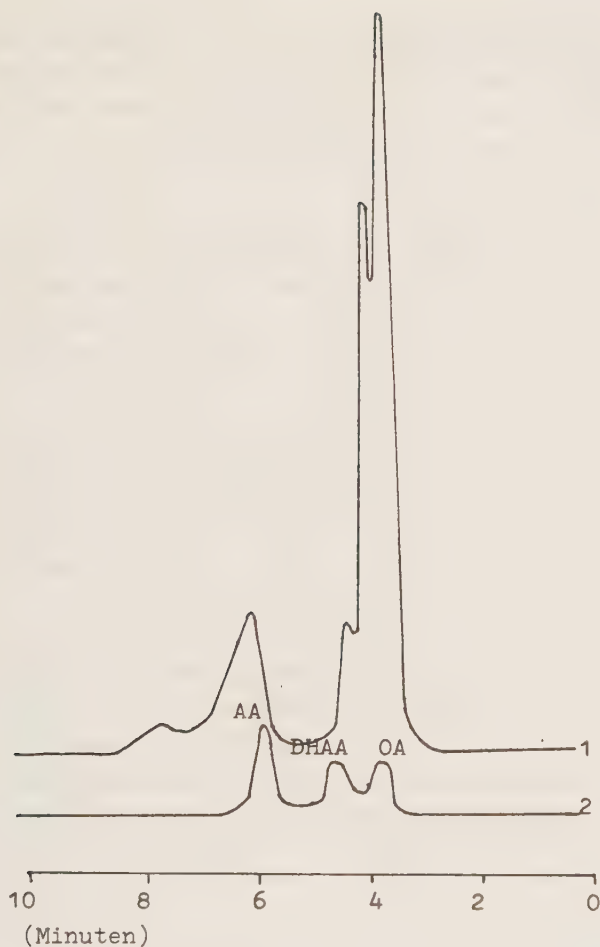


Abbildung 10: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Ascorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 3-6 Stunden nach Applikation einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Detlef" in Versuch IV (Chromatogrammdaten siehe Abb.3).

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Im fünften Versuch wurde versucht, ebenso wie in Versuch II mit "Django", den möglichen Einfluss von Streß auf den Vitamin C-Metabolismus weitgehend auszuschließen. "Detlef" wurden, nach Gewöhnung an die Versuchsbedingungen, 925 kBq der 1-¹⁴C-Ascorbinsäure peroral verabreicht.

Durch Urin, Atemluft und Kot wurden 91,2% der ¹⁴C-Aktivität wieder ausgeschieden. Aus Abbildung 11 ist der zeitliche Verlauf der Exkretion, kumulativ aufgetragen, zu ersehen. Tabelle 9 zeigt den Anteil an der Gesamtexkretion in den drei Ausscheidungsfraktionen innerhalb eines Meßzeitraums.

Die Elimination der ¹⁴C-Aktivität über die Nieren stellte mit 77,4% der verabreichten Aktivität wieder den Hauptexkretionsweg dar. Davon waren im Mittel 25% Oxalsäure, zusammen 75% Dehydroascorbinsäure und Ascorbinsäure (Abbildung 12). Im Laufe von 48 Stunden nach Aufnahme der Aktivität oxidierte "Detlef" 11,4% der applizierten Ascorbinsäure zu ¹⁴CO₂. Ein deutlich ausgeprägtes Maximum trat hierbei nicht auf. "Detlef" exhalierte besonders in den ersten 8 Stunden annähernd gleichbleibend hohe Anteile der Aktivität. In den Fäces wurden am ersten Versuchstag 1,3%, insgesamt bis Versuchsende 2,5% der applizierten Aktivität nachgewiesen. Im Serum des Tieres verblieben 0,2% der verabreichten Aktivität.

Tabelle 9: Versuch V: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer oral verabreichten 1- ^{14}C -Ascorbinsäure bei "Detlef", mit Gewöhnung an die Versuchsbedingungen.

Meßzeit- raum (h nach Appl.)	Atemluft		Urin		Kot	
	%	kBq	%	kBq	%	kBq
0-1	1,1	10,0	47,8	441,8	0,0	0,0
1-2	1,4	13,3				
2-3	0,9	8,6				
3-4	1,6	14,6	8,3	76,3	1,3	12,4
4-6	3,4	31,3				
6-8	1,7	16,1	4,7	43,2	0,3	2,3
8-24	0,6	5,2	4,8	44,7		
24-32	0,4	3,4				
32-48	0,3	2,4	3,2	29,4	0,5	4,0
48-56						
56-80			2,5	22,9	0,1	1,2
80-104			1,8	17,3	0,1	1,0
104-176			2,8	25,8	0,1	0,9
176-200			0,5	4,3	0,1	0,4
200-224			0,5	4,8		0,2
224-248			0,3	3,0		0,2
248-272			0,2	2,0		0,1
Summe	11,4	104,9	77,4	715,5	2,5	22,7

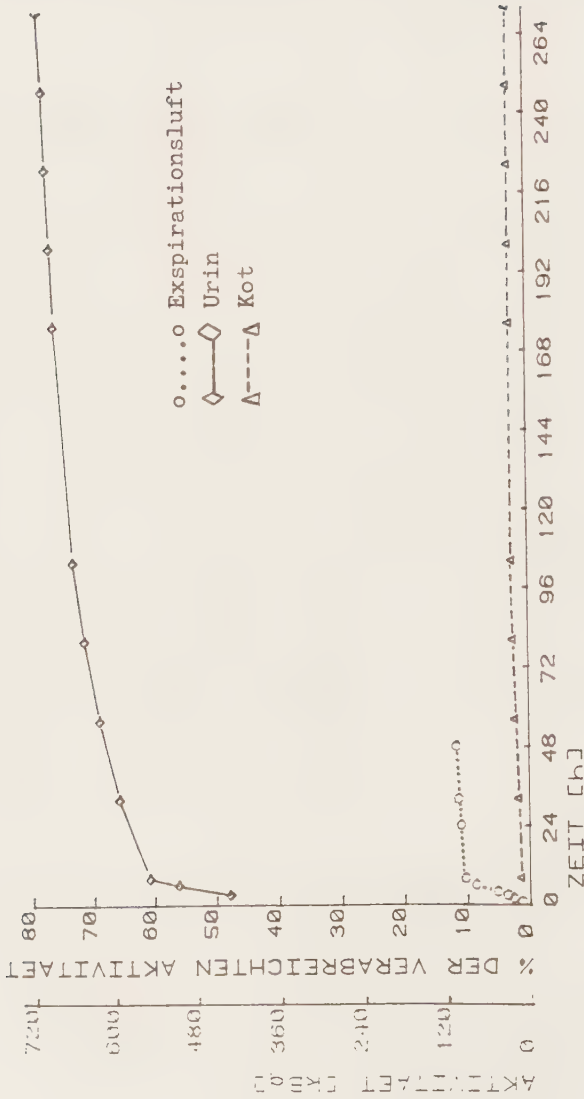


Abbildung 11: Versuch V: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verarbeiteten Aktivität einer oral gegebenen ^{14}C -Ascorbinsäure in % bzw. kBq nach Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bei "Detlef".

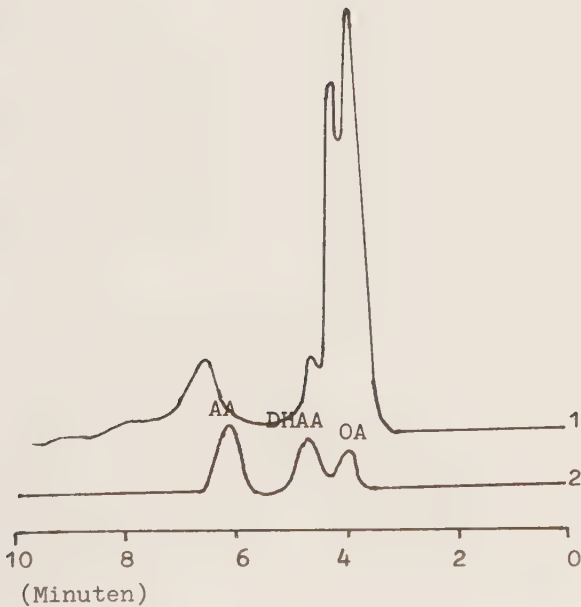


Abbildung 12: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Asorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 3-6 Stunden nach Applikation einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Detlef" in Versuch V (Chromatogrammdaten siehe Abb.3).

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Im sechsten Versuch wurden dem Affen Detlef 370 kBq 1-¹⁴C-Ascorbinsäure intravenös verabreicht. Es herrschten somit vergleichbare Bedingungen wie in Versuch III mit "Django".

Die Wiederfindung in den drei Ausscheidungsfraktionen betrug insgesamt 83,1% der applizierten Aktivität. In Tabelle 10 ist der Anteil der Ausscheidung an der verabreichten radioaktiv markierten Ascorbinsäure durch Urin, Atemluft und Kot angegeben. In Abbildung 13 ist der zeitliche Verlauf der Exkretion kumulativ aufgetragen.

Hauptausscheidungsweg war der Urin, in dem 72,7% der verabreichten Aktivität gemessen wurden. Hier erreichte die ¹⁴C-Ausscheidung nach 6 Stunden ein Maximum. Als Oxalsäure erschienen durchschnittlich 12%, als Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure zusammen 88% der im Urin befindlichen Aktivität (Abbildung 14).

Zu ¹⁴CO₂ wurden 7,5% der injizierten markierten Ascorbinsäure oxidiert. Das Maximum der ¹⁴C-Exspiration war mit 1,9% in der dritten Stunde wenig ausgeprägt.

Im Kot wurden 2,9% der verabreichten Aktivität gemessen, davon fast die Hälfte in den ersten 32 Stunden.

Im Serum wurde am letzten Versuchstag, bezogen auf das Gesamtserum des Tieres, ein Anteil von 0,3% der applizierten Aktivität nachgewiesen.

Tabelle 10: Versuch VI: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer intravenös verabreichten 1- ^{14}C -Ascorbinsäure bei "Detlef".

Meßzeit- raum (h nach Appl	Atemluft		Urin		Kot	
	%	kBq	%	kBq	%	kBq
0-1	0,5	1,8	7,2	26,6	0,1	0,4
1-2	0,9	3,3				
2-3	1,9	7,0				
3-4	1,4	5,1	22,9	84,7	0,2	0,9
4-6	1,0	3,5				
6-8	0,7	2,8				
8-24	0,7	2,5	9,3	34,3	0,7	2,9
24-32	0,3	1,0				
32-48	0,1	0,7				
48-56			4,6	17,4	0,5	1,7
56-80			2,9	10,9	0,1	0,3
80-104			1,7	6,2	0,6	2,1
104-176			8,4	31,0		
176-200			3,2	11,6		
200-224			2,8	10,6	0,2	0,7
224-248			2,6	9,8	0,2	0,7
248-272			2,2	7,9	0,1	0,5
Summe	7,5	27,7	72,7	269,1	2,9	10,9

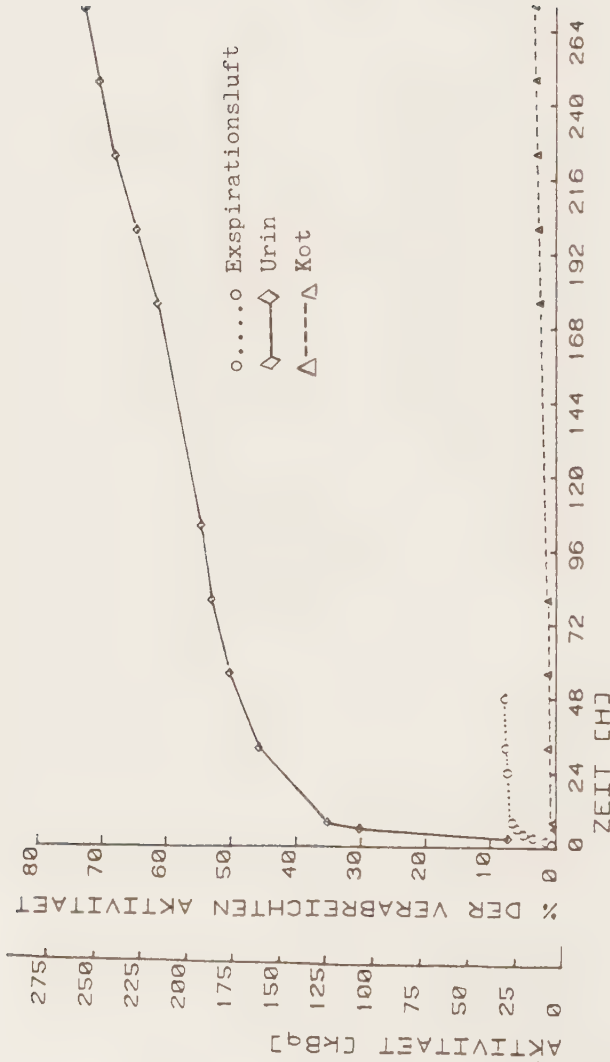


Abbildung 13: Versuch VI: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verabreichten Aktivität einer intravenös gegebenen 14C -Ascorbinsäure in % bzw. kBq nach Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bei "Detlef".

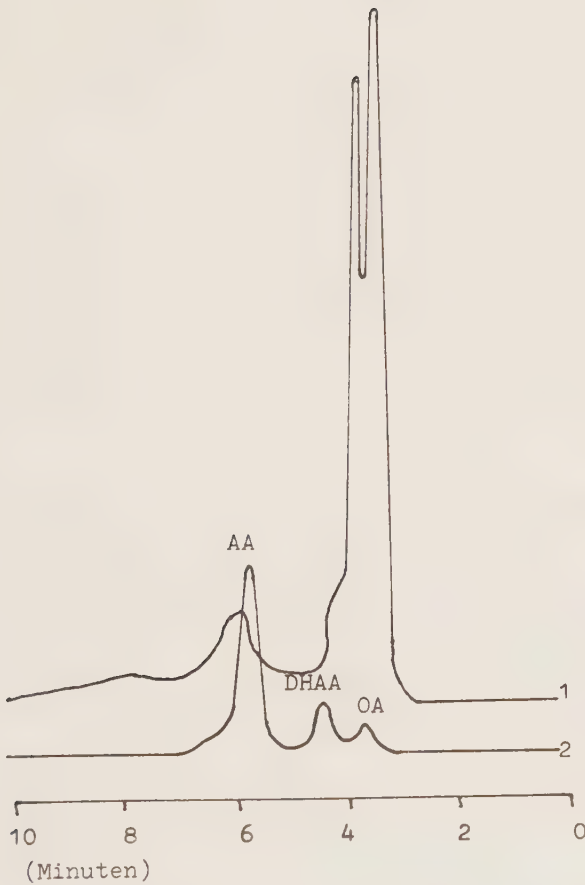


Abbildung 14: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Ascorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 3-6 Stunden nach Applikation einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Detlef" in Versuch VI (Chromatogrammdaten siehe Abb.3).

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Im letzten Versuch wurden dem Affen Gustav 925 kBq der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure peroral verabreicht. Gustav wurde in diesem Versuch vor allem während der ersten 8 Stunden ab Versuchsbeginn zeitweise belastet, indem er jeweils kurzfristig mit einer Pinzette immer wieder von der Sitzstange verdrängt (=Tratzen) sowie sporadisch ungewohnten akustischen und/oder optischen Reizen (siehe 3.1.2.) ausgesetzt wurde. In den ersten 48 Stunden war er insgesamt 90 Minuten gestreßt. Durch den Wechsel von unterschiedlichen Reizen, unterbrochen von Phasen, in denen das Tier nicht belastet wurde, sollte eine mögliche Gewöhnung an die zusätzliche Belastung weitgehend ausgeschlossen werden. Interessant war, wie lange nach Verabreichung der markierten Substanz sich Streß auf den Ascorbinsäurestoffwechsel auswirken kann.

Insbesondere in diesem Versuch erwies sich die in den ersten 8 Stunden durchgeführte kontinuierliche Aktivitätsmessung in der Atemluft mittels des zur ^{14}C -Messung modifizierten Tritiummonitors als vorteilhaft. Abbildung 15 zeigt den zeitlichen Verlauf der pro 200 Sekunden im Durchflußzählrohr gemessenen Impulsraten unter Einfluß des jeweilig angewandten, belastenden Reizes. Jeder dieser Reize führte innerhalb von höchstens 10 Minuten in etwa zu einer Verdoppelung der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation. Dieses Niveau konnte durch den Reiz zwar aufrecht erhalten, nicht aber weiter gesteigert werden. Wurde der Reiz ausgesetzt, fiel die $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation binnen maximal 6 Minuten jeweils wieder auf etwa die Hälfte der unter Belastung ausgeatmeten ^{14}C -Aktivität zurück. Diese vermehrte Oxidation der markierten Ascorbinsäure ergab sich bei jedem der angewandten Reize und unabhängig vom Zeitpunkt der Durchführung. Selbst am zweiten Versuchstag war es noch möglich, durch einen Reiz die $^{14}\text{CO}_2$ -Exhala-

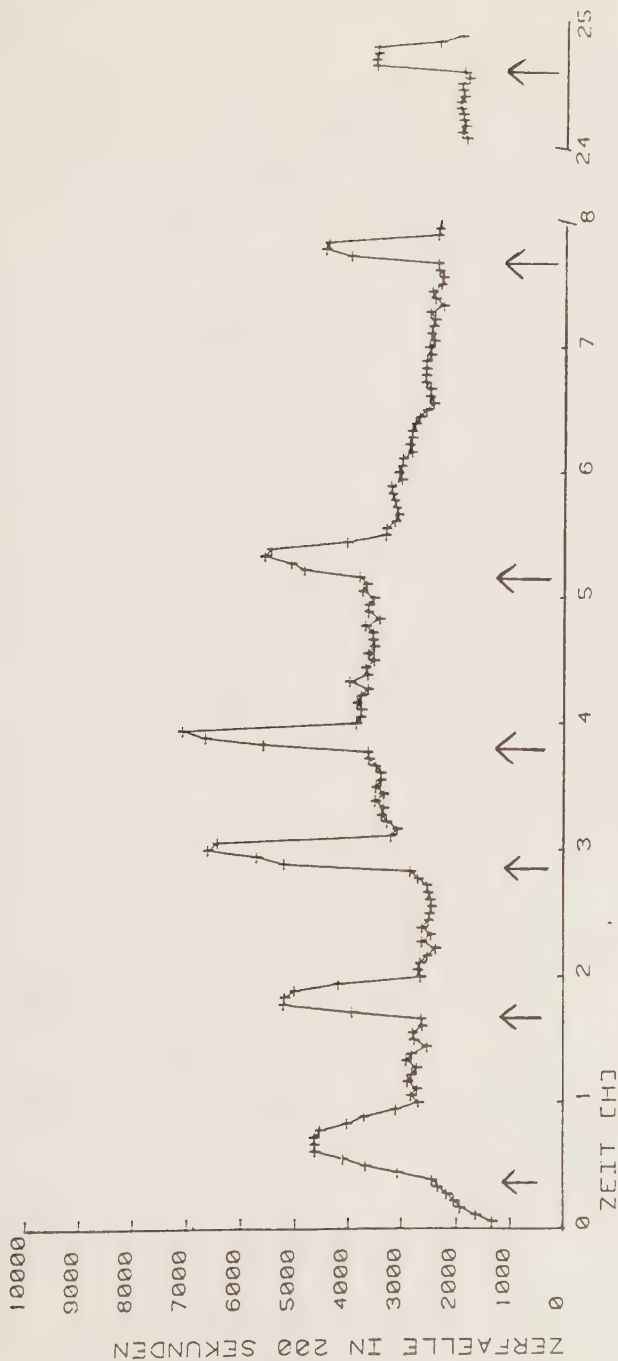


Abbildung 15: Versuch VII: Zeitlicher Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei "Gustav"
 ↑ = Beginn des Reizes. Beendet wurde der Reiz unmittelbar nachdem
 der höchste Wert des CO_2 -Peaks überschritten war

tion in etwa zu verdoppeln. Jedoch waren die gemessenen Impulsraten 24 Stunden nach Versuchsbeginn nur noch in etwa halb so hoch wie in der 4. Stunde, wo die höchsten Impulsraten gemessen wurden. Insgesamt oxidierte "Gustav" in den ersten 48 Stunden 7,9% der verabreichten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$.

In den drei Ausscheidungsfraktionen wurden insgesamt 88,8% der verabreichten Aktivität nachgewiesen. In Abbildung 16 ist der zeitliche Verlauf der ^{14}C -Elimination über die drei Ausscheidungswege kumulativ aufgetragen. Deren jeweiliger Anteil an der Exkretion der applizierten Aktivität pro Meßzeitraum ist in Tabelle 11 zu ersehen. Im Urin wurden 77,9% der verabreichten 925 kBq wiedergefunden. Von dieser im Urin befindlichen Aktivität erschienen durchschnittlich 43% als Oxalsäure und 57% als Dehydroascorbinsäure plus Ascorbinsäure (Abbildung 17). Die Messung des Kots ergab einen ^{14}C -Gehalt von 3% der verabreichten Aktivität, davon mehr als die Hälfte in den ersten 24 Stunden. Im Serum des Tieres verblieben 0,2% der applizierten Aktivität.

Tabelle 11: Versuch VII: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität über Atemluft, Urin und Kot in % bzw. kBq einer oral verabreichten l- ^{14}C -Ascorbinsäure bei "Gustav" unter wiederholter kurzfristiger Belastung.

Meßzeit- raum (h nach Appl.)	Atemluft		Urin		Kot			
	%	kBq	%	kBq	%	kBq		
0-1	0,3	3,0	11,2	103,9				
1-2	0,6	5,8						
2-3	0,8	7,3						
3-4	0,8	7,6	16,3	150,5	0,0 0,0			
4-6	1,7	15,4						
6-8	0,9	8,5	6,1	56,4	2,3 19,7			
8-24	1,9	17,5	15,8	146,6				
24-32	0,6	5,2						
32-48	0,3	3,0	10,4	96,5	0,2 1,8			
48-56								
56-80		7,9			72,7	0,2	2,1	
80-104		4,7			43,7	0,1	1,9	
104-176		3,3			24,7	0,2	1,5	
176-200		0,7			6,8		0,1	
200-224		1,0			9,3		0,1	
224-248		0,4			3,8		0,2	
248-272		0,1			1,3		0,2	
Summe	7,9	73,3	77,9	716,2	3,0	27,6		

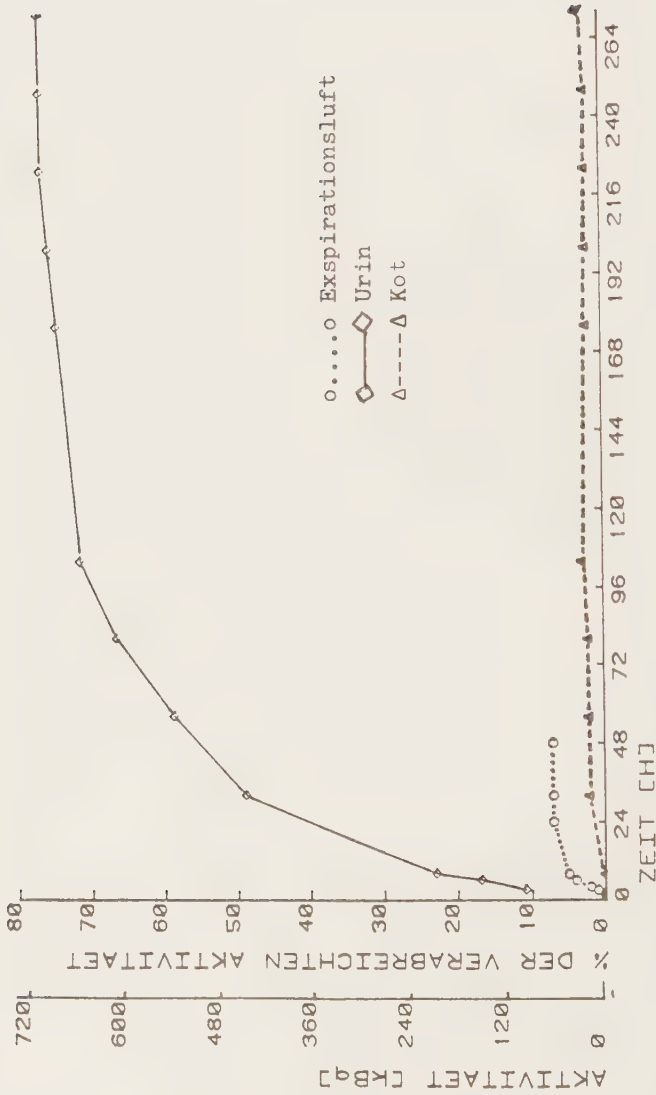


Abbildung 16: Versuch VII: Kumulativ aufgetragene Exkretion der verabreichten Aktivität einer oral gegebenen $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure in % bzw. kBq unter wiederholter kurzfristiger Belastung bei "Gustav".

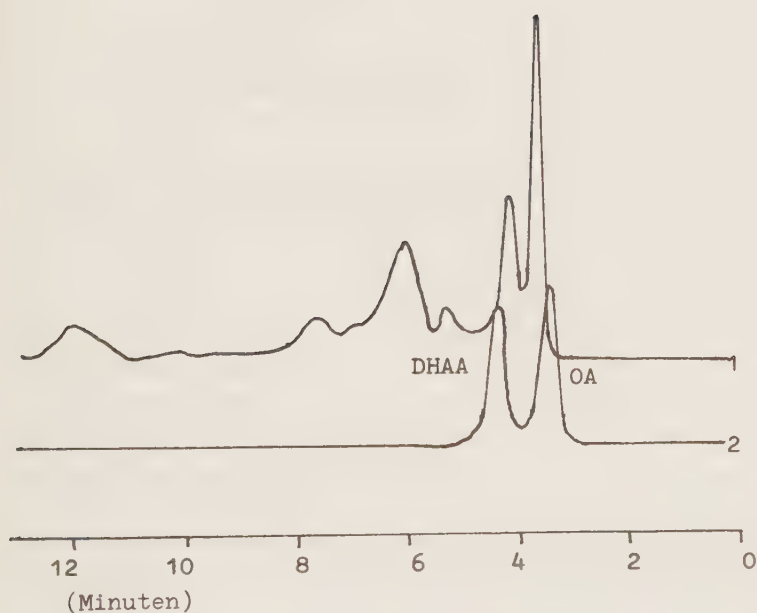


Abbildung 17: Auftrennung und Identifizierung der ^{14}C -haltigen Ascorbinsäure (AA) sowie der Metaboliten Oxalsäure (OA) und Dehydroascorbinsäure (DHAA) im Sammelurin 24-32 Stunden nach Applikation einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Gustav" in Versuch VII (Chromatogrammdaten siehe Abb.3)

1 = Absorption im Photometer

2 = ^{14}C -Messung im Radioaktivitätsmonitor

Vergleich zwischen den Tieren

In je drei unterschiedlichen Versuchen wurden die Affen Django und Detlef annähernd gleichen Bedingungen unterworfen. Bei weitgehend identischen Versuchsanordnungen in den Versuchen I und IV, bzw. II und V sowie III und VI, zeigten sich neben deutlichen Gemeinsamkeiten einige Unterschiede in der Exkretion der verabreichten radioaktiv markierten Ascorbinsäure zwischen beiden Affen.

In Abbildung 18 bzw. Abbildung 19 ist der zeitliche Verlauf der Exkretion von ^{14}C -Aktivität mit der Atemluft bei "Django" bzw. "Detlef" in den ersten 48 Stunden kumulativ aufgetragen. Der zeitliche Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation innerhalb der ersten 8 Stunden von "Django" ist dem von "Detlef" in den Abbildungen 20, 21 und 22 bei jeweils vergleichbaren Versuchsbedingungen gegenübergestellt.

Ohne Gewöhnung (Versuch I) bzw mit zusätzlicher Belastung (Versuch IV) war die Oxidation der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ am deutlichsten ausgeprägt. Allerdings exhalierete "Django" 50,4%, "Detlef" nur 20,1% der applizierten Aktivität innerhalb von 48 Stunden. In diesen "Streßversuchen" zeigte sich bei "Django" in der ersten Stunde ein deutlich ausgeprägtes Maximum der ^{14}C -Ausscheidung über die Atemluft, während "Detlef" in den ersten 8 Stunden annähernd gleichbleibend hohe Anteile der Aktivität exhalierete. In den Versuchen II und V, in denen die markierte Ascorbinsäure intravenös verabreicht wurde, bzw. in den Versuchen III und VI, wo die Tiere die Aktivität peroral ohne anschließende zusätzliche Belastung aufnahmen, war jeweils die ^{14}C -Elimination über die Atemluft bei "Django" und "Detlef" fast gleich groß.

Die Ausscheidung der verabreichten Aktivität mit dem Urin stellte bei beiden Tieren, mit Ausnahme von Versuch I bei "Django", den Hauptexkretionsweg dar. Die wiedergefundenen

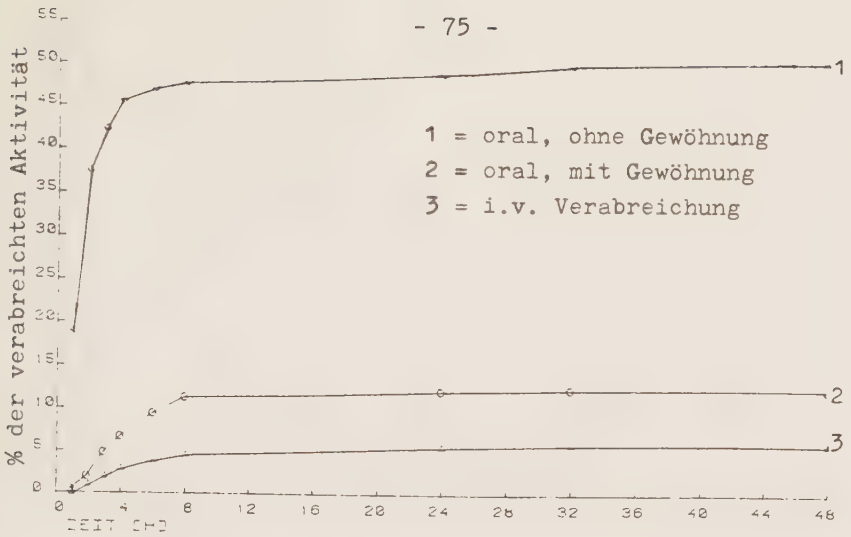


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei "Django".

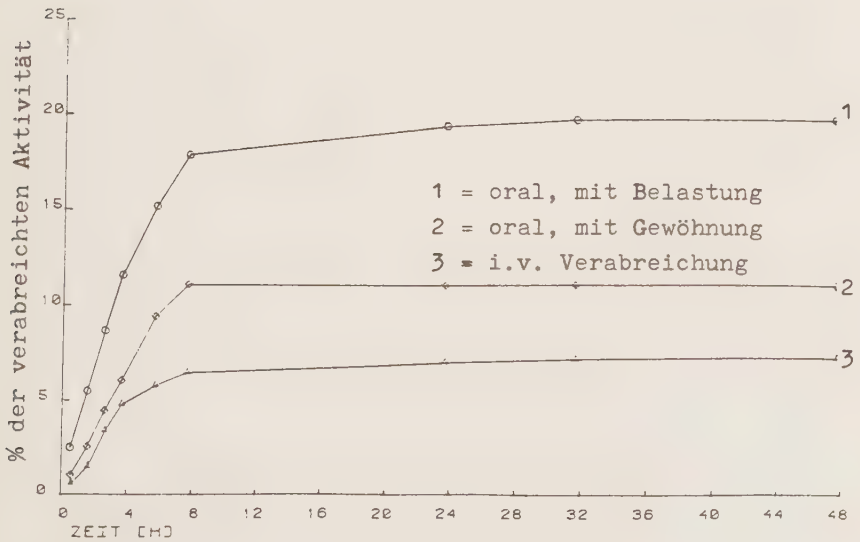


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei "Detlef".

Aktivitätsmengen wiesen in den "Streßversuchen" I bzw. IV, mit 30,4% bzw. 60,6% Anteil an der Elimination der verabreichten Aktivität, einen deutlichen Größenunterschied auf. In den anderen vergleichbaren Versuchen II und V, bzw. III und VI, schieden die beiden Tiere annähernd gleichviel Aktivität mit dem Urin aus. Die ^{14}C -Eliminierung mit dem Harn verlief bei beiden Tieren in allen Versuchen innerhalb der ersten 8 Stunden rasch, bis zur 56. Stunde weniger schnell und in den restlichen Versuchstagen relativ langsam. Bei beiden Tieren konnten neben unverstoffwechselter Ascorbinsäure zwei Metaboliten nachgewiesen werden, die in den vergleichbaren Versuchen bei beiden Tieren zu etwa gleichen Anteilen vorlagen.

Ein Unterschied zwischen "Django" und "Detlef" lag in der ^{14}C -Eliminierung über den Kot vor. "Django" schied durchschnittlich 6,5% ($\pm 3,8$), Detlef im Mittel 3,3% ($\pm 1,1$) der verabreichten Aktivität mit dem Kot aus.

Die Wiederfindung des Tracers in den drei Ausscheidungsfractionen einschließlich der am letzten Versuchstag gemessenen, im Serum der Tiere verbliebenen Aktivität, war in den Versuchen I bis III bei "Django" mit durchschnittlich 90,0% ($\pm 0,3$) insgesamt etwas höher als bei Detlef in den Versuchen IV bis VI mit im Mittel 86,5% ($\pm 3,9$).

Der Affe Gustav wurde in seinem Versuch nur zum Teil den Bedingungen unterworfen, die bei "Django" in Versuch I bzw. "Detlef" in Versuch IV herrschten. In Tabelle 12 sind die in den jeweiligen Versuchen bei "Django", "Detlef" und "Gustav" über die drei Ausscheidungswege eliminierten ^{14}C -Anteile in % der verabreichten Aktivität, die Anteile der identifizierten ^{14}C -haltigen Metaboliten im Urin sowie die im Serum verbliebene Aktivität, unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen, einander gegenübergestellt.

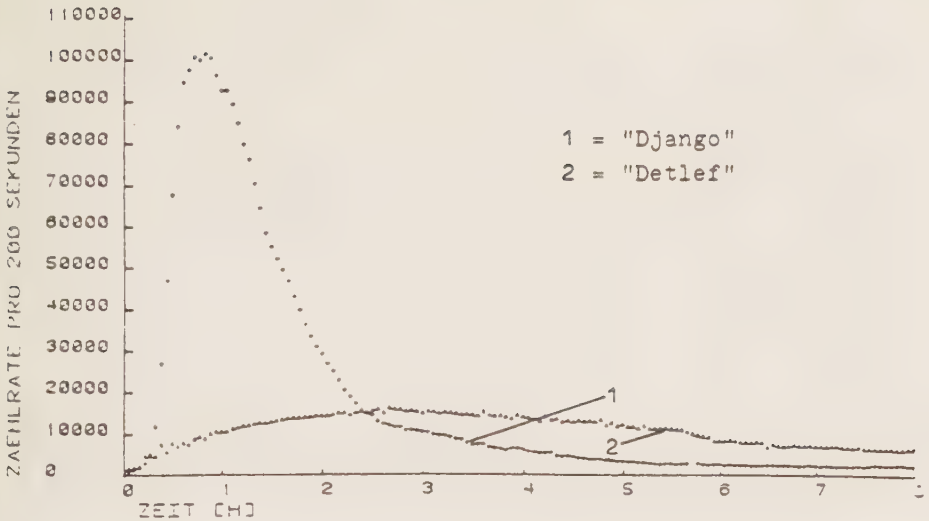


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der ^{14}C -Exhalation unter "Stressbedingungen".

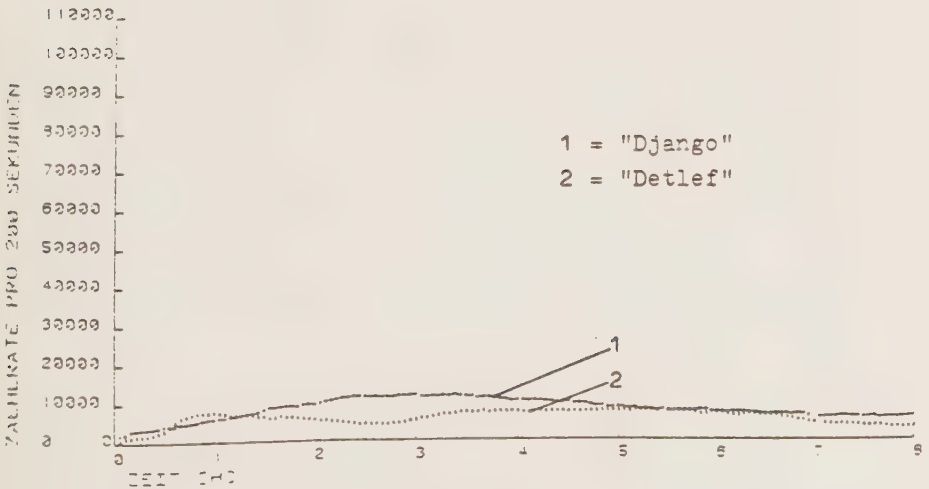


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der ^{14}C -Exhalation nach Gewöhnung an die Versuchsbedingungen.

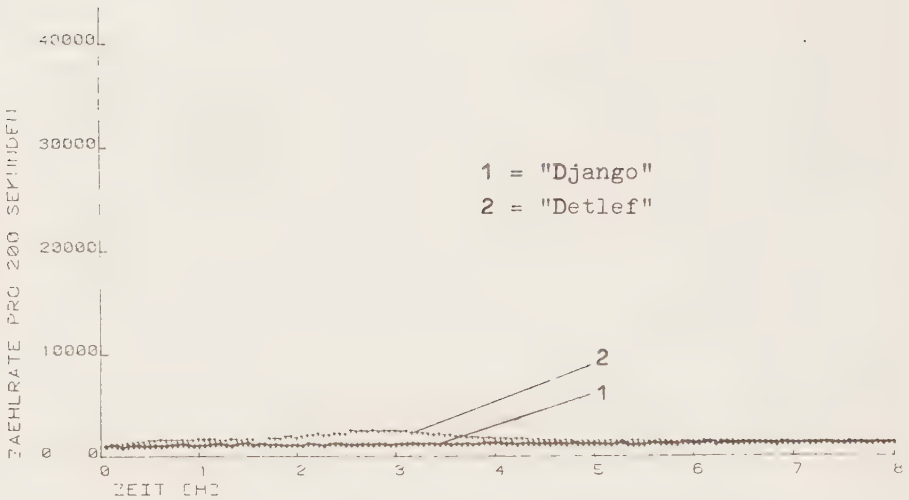


Abbildung 22: Zeitlicher verlauf der ^{14}C -Exhalation bei intravenöser Gabe von 1- ^{14}C -Ascorbinsäure

"Gustav" exhalierte mit 7,9% der applizierten Aktivitätsmenge bedeutend weniger $^{14}\text{CO}_2$ als "Django" oder "Detlef", bei allerdings nur bedingt vergleichbaren Bedingungen.

Die Eliminierung der ^{14}C -Aktivität mit dem Urin lag mit 77.9% in etwa in der Größenordnung, wie sie sich bei "Django" bzw. "Detlef" in den Versuchen ohne Belastung II und III, bzw. IV und VI ergab. Die Exkretion der Aktivität über den Kot entsprach mit 3,0% der verabreichten Aktivität etwa dem Anteil, den "Detlef" in seinen Versuchen mit dem Kot eliminierte.

Tabelle 12: Ausscheidung von ^{14}C -Aktivität unter den jeweiligen Versuchsbedingungen

Versuch	I	II	III	IV	V	VI	VII
Affe	Django	Django	Django	Detlef	Detlef	Detlef	Gustav
appl. Aktivität	925 kBq p.os	925 kBq p.os	370kBq i.v.	925 kBq p.os	925 kBq p.os	370 kBq i.v.	925 kBq p.os
zusätzliche Belastung	¹	-	-	+	-	-	²
$^{14}\text{CO}_2$ (48 h)	50,4%	13,3%	6,7%	20,1%	11,4%	7,5%	7,9%
^{14}C im Urin (12 d)	30,4%	72,2%	79,9%	60,6%	77,4%	72,7%	77,9%
^{14}C im Kot (12 d)	10,3%	5,0%	4,2%	3,6%	2,5%	2,9%	3,0%
^{14}C im Serum ³	0,2%	0,2%	0,2%	0,3%	0,2%	0,3%	0,2%
Summe	91,3%	90,7%	91,0%	84,6%	91,4%	83,4%	89,0%

Anteil der Metaboliten an der ^{14}C -Aktivität im Urin :

Oxalsäure	37,0%	28,0%	17,0%	34,0%	25,0%	12,0%	43,0%
Ascorbat ⁴	63,0%	72,0%	83,0%	66,0%	75,0%	88,0%	57,0%

1= nicht an die Versuchsbedingungen gewöhnt 2= Belastung jeweils nur kurzfristig
3= Serumaktivität am letzten Versuchstag 4= Ascorbinsäure + Dehydroascorbinsäure

4 DISKUSSION

Mittels der Isotopenexkretionsmethode wurden Aufschlüsse über den Ascorbinsäurestoffwechsel bei Krallenaffen der Spezies *Callithrix jacchus* gewonnen. Die unterschiedliche Verteilung der Exkretion von Vitamin C und deren Metabolite in Urin, Atemluft und Kot bei peroraler und intravenöser Zufuhr, unter dem Einfluß von Streß bzw. nach Gewöhnung an die Versuchsbedingungen, werden im Folgenden diskutiert.

4.1 $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei intravenöser und peroraler Gabe des Vitamins

Die Verstoffwechselung von Ascorbinsäure zu Kohlendioxid ist bei Krallenaffen der Spezies *C. jacchus* sowohl bei peroraler als auch bei intravenöser Gabe des Vitamins nachweisbar. Jedoch ist die Höhe der $^{14}\text{CO}_2$ -Exspiration, im Gegensatz zu Ratte und Meerschweinchen, abhängig von der Art der Applikation. Die relativ niedrigen Oxidationsraten zu $^{14}\text{CO}_2$ bei den Affen Django und Detlef von 6,7% bzw. 7,5% nach intravenöser Zufuhr des radioaktiv markierten Vitamins, stehen einer deutlich höheren $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei "Django" von 13,3% bzw. 50,4% und bei "Detlef" von 11,4% bzw. 20,1% nach peroraler Applikation gegenüber. Die CO_2 -Produktion aus der zugeführten Ascorbinsäure beginnt bei beiden Verabreichungsformen schon wenige Minuten nach Applikation. Ähnlich früh setzt die CO_2 -Produktion bei Meerschweinchen nach peroraler Verabreichung des Vitamins ein (HORNIG and HARTMANN, 1982). Bei Mensch und Makaken dagegen ist erst nach etwa 5 Stunden eine deutliche CO_2 -Ausscheidung zu beobachten.

Die unterschiedlichen kinetischen Verhältnisse der CO_2 -Ausscheidung bei den diesbezüglich untersuchten Spezies und das abweichende Verhalten des Ascorbinsäuremetabolismus je nach Applikationsart bei den Tierarten und beim Mensch werfen die Frage nach dem Entstehungsort des CO_2 auf.

Der Peak in der CO_2 -Ausscheidung tritt bei Meerschweinchen nach 30 Minuten, bei der Ratte nach 2-3 Stunden und bei Primaten (Mensch und Makaken) nach ca. 10 Stunden auf. In unseren Versuchen war bei den *Callithrix jacchus*-Afften die größte CO_2 -Ausscheidung nach 1-3 Stunden erreicht. Während die CO_2 -Produktion bei Ratte und Meerschweinchen sowohl bei peroraler als auch bei intraperitonealer Applikation gleich und sehr hoch ist, wird beim Menschen nach intravenöser Injektion fast kein CO_2 ausgeschieden. Bei Makaken ist mir eine derartige Untersuchung nicht bekannt.

Als Entstehungsorte für das CO_2 aus Ascorbinsäure werden die Leber und, als präsystemischer Ort, der Darm bzw. die Darmwand diskutiert.

Bei Meerschweinchen wird die Leber als Entstehungsort der CO_2 -Produktion angesehen, wo nach Abbau der Dehydroascorbinsäure zu 2,3-Diketogulonsäure mittels des Enzyms Dehydroascorbinsäuredehydrogenase, die Oxidation zu CO_2 erfolgt (SCHMIDT et al., 1983). Als zusätzlicher CO_2 -Bildungsort wurde bei dieser Spezies die Darmwand vermutet, weil der CO_2 -Ausscheidungspeak bereits vor den Gewebsspiegelmakima auftritt. Gegen die Mitbeteiligung des Darms spricht aber, abgesehen davon, daß die Applikationsart keinen Einfluß auf die Höhe der CO_2 -Entstehung nimmt, eine in vitro-Untersuchung mit Homogenaten von Magen, Darm und Dünndarmflora von Ratte und Meerschweinchen. Diese Ansätze führten nach Ascorbinsäurezugabe zu keiner nennenswerten CO_2 -Produktion.

Beim Menschen setzt zwar die CO_2 -Produktion erst relativ spät nach Aufnahme der Ascorbinsäure ein, da jedoch die nur durch hohe perorale Ascorbinsäureaufnahme provozierbare CO_2 -Ausscheidung bei intravenöser Applikation der markierten Ascorbinsäure nur in sehr geringem Ausmaß auftritt, nimmt man eine präsystemische Ascorbinsäureverstoffwechselung zu CO_2 an. Es ist ein chemischer Abbau oder eine mikrobielle Zersetzung im Darm denkbar, dem das Vitamin bei Sättigung des aktiven Resorptionsmechanismus durch hohe perorale Zufuhr länger ausgesetzt wäre (KALLNER et al., 1985).

Bei Krallenaffen dagegen wurden bei erhöhter peroraler Zufuhr von Ascorbinsäure verminderte Oxidationsraten zu CO_2 gemessen. Unterstellt man, daß bei diesen Tieren die Produktion von CO_2 aus Ascorbinsäure stets in gleicher Menge im Organismus erfolgt, unabhängig von der Zufuhr, dann lassen sich die geringen relativen Oxidationswerte bei hoher Zufuhr des Vitamins erklären. Dies würde bei Krallenaffen für die Oxidation zu CO_2 nach der Resorption aus dem Darm sprechen (GEYER, 1987). In unseren Untersuchungen mit Krallenaffen der Spezies *Callithrix jacchus* trat bei gleich hoher Vitamin C-Versorgung über das Futter eine vergleichbar geringe Oxidation der verabreichten Ascorbinsäure jedoch nicht auf.

Gegen die alleinige postresorptive CO_2 -Produktion spricht der Verlauf der Eliminierung von Ascorbinsäure und deren Metaboliten mit dem Urin. Eine geringere Decarboxylierung bei der intravenösen Gabe der Ascorbinsäure könnte durch eine raschere Eliminierung des Vitamins mit dem Urin und einem damit verbundenen geringeren Ascorbinsäureangebot im Organismus erklärt werden. Da jedoch die Ausscheidung der zugeführten Ascorbinsäure mit dem Urin bei

der intravenösen Gabe durchschnittlich nicht schneller verlief als bei der peroralen Gabe, ist eine ausschließlich postresorptive Decarboxylierung des Vitamins bei *C. jacchus* wenig wahrscheinlich.

Die höhere und sehr früh einsetzende Oxidation zu CO_2 bei *C. jacchus* nach peroraler Gabe deutet auf eine vermehrte präresorptive Verstoffwechselung der Ascorbinsäure bei diesen Tieren hin. Allerdings spricht gegen die alleinige präsystemische CO_2 -Produktion die zwar geringere, aber deutlich ausgeprägte $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei intravenöser Gabe der 1- ^{14}C -Ascorbinsäure.

Die genaue Lokalisation und der Mechanismus der Oxidation von Ascorbinsäure zu CO_2 bleiben weiterhin unklar. Ein präresorptiver chemischer Abbau im sauren Darmmilieu scheint eher unwahrscheinlich, da Ascorbinsäure in saurer wässriger Lösung (unter pH 6) stabil ist (BÄSSLER und LANG, 1981). Eine Decarboxylierung in der Darmwand bzw. mikrobielle Zersetzung des Vitamins wäre denkbar. Jedoch zeigten in vitro-Untersuchungen bei Meerschweinchen und Ratte weder in Homogenaten von Magen und Darm noch von Dünndarmflora nennenswerte CO_2 -Freisetzung nach Zugabe von Ascorbinsäure (SCHMIDT et al., 1983). Für die Verstoffwechselung von Ascorbinsäure zu CO_2 nach intravenöser Gabe bei Krallenaffen muß neben einer möglichen systemischen Decarboxylierung des Vitamins, wie sie beim Meerschweinchen in der Leber vermutet wird, auch eine Sekretion der zugeführten Ascorbinsäure oder von deren Metaboliten in den Darm mit dortiger Oxidation zu CO_2 in Betracht gezogen werden. Denn auch bei intravenöser Zufuhr von 1- ^{14}C -Ascorbinsäure ist wenige Stunden nach Applikation Aktivität im Kot nachweisbar. Zwar kann auch bei sofortiger Entnahme des Kots nach dem Kotabsatz dessen Kontamination mit ^{14}C -haltigem Harn bzw. Rückständen

^{14}C -haltiger Spülflüssigkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch wurden in fast allen Versuchen die höchsten Aktivitätswerte im Kot erst mehrere Stunden nach der höchsten ^{14}C -Ausscheidung mit dem Urin gemessen.

Eine Möglichkeit, den Ort der CO_2 -Produktion bei *C. jacchus* näher einzugrenzen, wäre, den Tieren bei unmittelbar nach peroraler Gabe des ^{14}C -markierten Vitamins in kurzen Zeitabständen Blut zu entnehmen, um feststellen zu können, ob $^{14}\text{CO}_2$ vor oder nach nennenswerten ^{14}C -Ascorbinsäuregehalten im Serum exhaliiert wird. Da jedoch die zeitlich aufwendige Blutentnahme nur außerhalb der Stoffwechselkammer durchgeführt werden kann, wäre eine gleichzeitige Messung der ^{14}C -Exhalation nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund wurde auf eine derartige Versuchsanordnung verzichtet.

Auch die Möglichkeit einer weitgehenden Reduzierung der Darmflora mittels Antibiotika wurde in Erwägung gezogen, um Aufschlüsse über eine mögliche Beteiligung von Mikroorganismen bei der Oxidation von Ascorbinsäure zu CO_2 zu gewinnen. Da ein solches Vorgehen jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit bei diesen Tieren zu Verdauungsstörungen führen würde, die eine verkürzte Verweildauer im Darm und damit eine verminderte Resorptionsrate zur Folge hätten, wurden derartige Studien nicht durchgeführt. Auch wäre bei einer unter diesen Bedingungen zu erwartenden Diarrhoe eine getrennte Sammlung von Kot und Urin nicht möglich gewesen.

4.2 $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei Streß

Unter Streßbedingungen verstoffwechseln sowohl Makaken als auch Krallenaffen ^{14}C -Ascorbinsäure vermehrt zu $^{14}\text{CO}_2$ (siehe 2.5). Auch in unseren Untersuchungen mit Krallenaffen der Spezies *Callitrix jacchus* stieg die Oxidationsrate einer oral verabreichten Ascorbinsäure unter dem Einfluß von Streß. Ohne Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bzw. mit andauernder zusätzlicher Belastung war die Oxidation der 1- ^{14}C -Ascorbinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ mit 50,4% bzw. 20,1% der verabreichten Aktivität bei "Django" und "Detlef" am deutlichsten ausgeprägt. In diesen "Streßversuchen" zeigte sich bei "Django" in der ersten Stunde ein deutlich ausgeprägtes Maximum, während "Detlef" in den ersten 8 Stunden annähernd gleichbleibend hohe Anteile der Aktivität exhalierte. Möglicherweise ist dieser individuelle Unterschied, sowohl in der Quantität als auch im zeitlichen Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Abgabe, auf die unterschiedliche Belastung der Tiere zurückzuführen. Demnach könnten die ungewohnten Versuchsbedingungen, denen "Django" unmittelbar nach dem Transport aus dem Tierstall in den Versuchsraum ausgesetzt war, eine viel schwerwiegendere, aber nicht so dauerhaft anhaltende Belastung darstellen, gegenüber den akustischen und optischen Reizen, denen "Detlef" in den ersten 8 Stunden fast permanent ausgesetzt war. Auch in einem weiteren Versuch mit dem Affen "Gustav" ließ sich die $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation, bei jeweils nur kurzfristig angewandten Reizen, binnen weniger Minuten bis zu einem bestimmten Niveau anheben und dort aufrechterhalten, nicht aber weiter steigern. Wurde der Reiz ausgesetzt, fiel die $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation innerhalb weniger Minuten auf etwa die Hälfte der unter Belastung ausgeatmeten ^{14}C -Aktivität zurück. "Gustav" exhalierte insgesamt deutlich weniger $^{14}\text{CO}_2$ als "Django" oder

"Detlef" unter Streßbedingungen, allerdings betrug die gesamte Belastungsdauer nur 90 Minuten. Die Oxidationsrate der markierten Ascorbinsäure zu CO_2 ließ sich bei "Gustav" selbst am zweiten Versuchstag durch einen akustisch-optischen Reiz noch verdoppeln, jedoch waren die 24 Stunden nach Versuchsbeginn gemessenen Impulsraten nur noch halb so hoch wie in der vierten Stunde, wo die höchste $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation gemessen wurde. Zwar könnte die bei "Detlef" und "Gustav" durch Streßinduktion nur bis zu einem bestimmten Niveau steigerbare CO_2 -Produktion aus Ascorbinsäure auf einen in seiner Kapazität begrenzten Decarboxylierungsmechanismus hinweisen, jedoch spricht die extrem hohe CO_2 Produktion von "Django" in seinem Streßversuch dagegen. Während die schon wenige Minuten nach Versuchsbeginn einsetzende $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation eine präresorptive Decarboxylierung des Vitamins möglich erscheinen läßt, spricht die noch am zweiten Versuchstag bei "Gustav" durch Streß verdoppelte $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation für die eindeutig postresorptive Oxidation der Ascorbinsäure zu CO_2 .

Die rasch einsetzende und deutlich ausgeprägte Decarboxylierung der zugeführten Ascorbinsäure bei Streß weist auf einen erhöhten Ascorbinsäurekatabolismus unter dem Einfluß von psychischer Belastung hin. Allerdings muß auch in Erwägung gezogen werden, daß für das schnelle Ansprechen der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung unter Streß eine erhöhte Atemfrequenz verantwortlich sein könnte. Die insgesamt ausgeschiedene $^{14}\text{CO}_2$ -Menge wäre davon aber nicht betroffen. In allen Versuchen wurden bei C. jacchus am zweiten Tag nur noch relativ geringe $^{14}\text{CO}_2$ -Mengen ausgeatmet. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt schon der Großteil der zugeführten Aktivität über die drei Ausscheidungswege eliminiert.

4.3 ^{14}C -Exkretion im Urin

Mit Ausnahme des ersten Versuchs stellte die Eliminierung von Ascorbinsäure und deren Metaboliten mit dem Urin bei *C. jacchus* den Hauptausscheidungsweg dar. Während in den Versuchen, in denen die Tiere an die Versuchsbedingungen gewöhnt waren, zwischen 72,2% und 79,9% der Aktivität einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure im Urin gemessen wurden, war die ^{14}C -Eliminierung über diesen Exkretionsweg ohne Gewöhnung an die Versuchsbedingungen mit 30,4%, bzw. unter andauernder zusätzlicher Belastung mit 60,6%, deutlich geringer. Da in allen Versuchen die Wiederfindung von ^{14}C -Aktivität binnen 12 Versuchstagen in etwa gleich hoch war, erklärt sich die geringere Exkretion des radioaktiv markierten Vitamins und seiner Metaboliten mit dem Urin aus der vermehrten Verstoffwechselung der Ascorbinsäure zu CO_2 unter psychischer Belastung (siehe 4.2.).

Frühere Untersuchungen mit Krallenaffen führten ebenfalls zu dem Ergebnis, daß bei diesen Tieren die renale Exkretion den Hauptweg der Ausscheidung von Vitamin C und dessen Metaboliten darstellt (GEYER, 1987). Allerdings werden bei diesen Versuchen teilweise viel geringere Wiederfindungsraten von ^{14}C -Aktivität, insbesondere im Urin, nach oraler Gabe einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure festgestellt. Bei Übereinstimmung der Versuchsbedingungen, auch gleich hohem Vitamin C-Gehalt im Futter, fällt auf, daß damals geringere Mengen an Spülflüssigkeit zur Gewinnung der Harnproben in Stoffwechselkammer und -käfig eingesetzt wurden. Es ist denkbar, daß so der nur tröpfchenweise abgesetzte Harn nicht vollständig erfaßt und zum Abfluß gebracht werden konnte. Andererseits muß in Betracht gezogen werden, daß individuelle Unterschiede im Vitamin C-Status der Tiere und damit in der biologischen Halbwertszeit der

Ascorbinsäure im Organismus die Ursache für eine unterschiedlich rasche Eliminierung von Ascorbinsäure und ihren Metaboliten mit dem Urin sein könnten (siehe 4.6.).

Die renale Exkretion von ^{14}C -Aktivität erreichte sowohl bei peroraler als auch bei intravenöser Zufuhr 3-6 Stunden nach Applikation das Maximum. Danach verlief die Eliminierung der Aktivität mit dem Urin in drei Phasen. Nach 8 Stunden waren jeweils mindestens ein Drittel, bis zur 56. Stunde mehr als die Hälfte und in den restlichen Versuchstagen der restliche Anteil der im Urin gemessenen ^{14}C -Aktivität ausgeschieden.

Die Eliminierung der zugeführten Ascorbinsäure verlief bei der intravenösen Gabe durchschnittlich nicht schneller als bei der peroralen Zufuhr. Daraus kann auf eine rasche Resorption des Vitamins im Darm bei oraler Aufnahme geschlossen werden.

Alle Versuche wurden unter der Vitamin C-Hochversorgung von 4 g pro kg Koloniediät durchgeführt. Der Vitamin C-Bedarf der Weißbüschelaffchen ist ab einer Versorgung von 0,5 g pro kg Futter sicher abgedeckt (KERN, 1986). Die zusätzliche Gabe von 211 μg (peroral) bzw. 88 μg (intravenös) stellt, bezogen auf die Vitamin C-Versorgung über das Futter (50 mg/Tag), keine nennenswerte Steigerung der Ascorbinsäureaufnahme dar.

4.4 Ascorbinsäuremetaboliten im Urin

Mittels HPLC konnten neben unverstoffwechselter Ascorbinsäure zwei Metaboliten im Urin bei *C. jacchus* aufgetrennt und aufgrund ihrer Radioaktivität quantitativ bestimmt werden. Anhand ihrer Retentionszeiten wurden die Oxal-

säure, die Dehydroascorbinsäure und die Ascorbinsäure nachgewiesen. Diketogulonsäure, die mit der beschriebenen Methode ebenfalls erfaßt wird, trat in keiner Urinprobe auf.

Der prozentuale Anteil der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure unterlag von Probe zu Probe Schwankungen, ohne erkennbaren Grund. Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure bilden ein Redoxsystem, in dem die eine Substanz unter bestimmten Bedingungen nichtenzymatisch in die andere Substanz überzugehen vermag (BÄSSLER und LANG, 1983). Es ist denkbar, daß Spuren von Schwermetallionen, die Anwesenheit von Luftsauerstoff, Schwankungen im pH-Wert und der unterschiedliche Gehalt an "Schutzstoffen", wie z.B. verschiedene Säuren, Monosaccharide und Pectine, in den gewonnenen Proben zu einer unterschiedlich ausgeprägten Oxidation der Ascorbinsäure führten. Diese mögliche in vitro-Reaktion hielt sich jedoch in Grenzen, wie allein die Tatsache zeigt, daß in den Proben das Oxidationsprodukt der Dehydroascorbinsäure, die 2,3-Diketogulonsäure, nicht nachgewiesen werden konnte. Das kann aber auch an der Instabilität der 2,3-Diketogulonsäure liegen.

Den in allen Versuchen relativ hohen Anteilen von 57-83% Ascorbinsäure plus Dehydroascorbinsäure stehen geringere Anteile von 12-43% Oxalsäure an der im Urin befindlichen Aktivität gegenüber. Dies läßt darauf schließen, daß bei 4 g Ascorbinsäure pro kg Koloniediät der Schwellenwert im Serum für die renale Exkretion überschritten und Vitamin C unverstoffwechselt ausgeschieden wird. Dies stimmt überein mit früheren Untersuchungen bei Krallenaffen, wo sich bei vergleichbarer Vitamin C-Zufuhr 70% der im Urin gemessenen Impulsrate als unverstoffwechselte Ascorbinsäure erwiesen. Umgekehrt lagen bei niedriger Vitamin C-Zufuhr nur noch

geringe Mengen unverstoffwechselter Ascorbinsäure im Urin vor (GEYER, 1987). Auch bei Makaken beträgt der Anteil nichtverstoffwechselter Ascorbinsäure bei hoher Vitamin C-Versorgung 75%, bei niedriger Versorgung dagegen nur 10-20% der mit dem Urin eliminierten Aktivität. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen liegen bei diesen Tieren bei hoher Vitamin C-Aufnahme nur 7% der im Urin befindlichen Aktivität als Oxalsäure vor, während deren Anteil bei Niedrigversorgung 25-48% beträgt. Bei Makaken konnte ebenfalls die 2,3-Diketogulonsäure nicht nachgewiesen werden (TILLOTSON and MC GOWN, 1981).

Die höchsten Anteile von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure sowie die geringsten Anteile von Oxalsäure an der im Urin gemessenen Impulsrate fanden sich bei C. jacchus nach intravenöser Gabe von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure. Die vermehrte Ausscheidung des unverstoffwechselten Vitamins könnte durch den bei intravenöser Zufuhr sofort auftretenden hohen $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäurespiegel im Serum bedingt sein. Allerdings erfolgte die Eliminierung von ^{14}C -Aktivität mit dem Urin bei intravenöser Gabe durchschnittlich nicht schneller als bei der peroralen Zufuhr, wobei die zugeführte $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei der peroralen Zufuhr einem erhöhten oxidativen Abbau unterliegt.

4.5 ^{14}C -Exkretion in den Fäces

Sowohl bei peroraler als auch bei intravenöser Zufuhr von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure war wenige Stunden nach deren Applikation Aktivität im Kot nachweisbar. Die Hauptmenge wurde in allen Versuchen in den maximal ersten 56 Stunden nach Versuchsbeginn gemessen. Der Anteil der Exkretion im Kot an der Ausscheidung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure lag bei

"Django" mit 4,2-10,3% höher als bei "Detlef" und "Gustav" mit 2,5-3,6%. Während in den Versuchen mit "Django" Kot und Urin zu festen Zeitpunkten gemeinsam entnommen wurden, erfolgte bei "Detlef" und "Gustav" die Kotentnahme jeweils unmittelbar nach dem Kotabsatz. Es ist denkbar, daß in den Versuchen mit "Django" eine Kontamination der Fäces mit ^{14}C -haltigem Urin zu dem relativ hohen Aktivitätsnachweis im Kot dieses Tieres führte. Da jedoch in fast allen Versuchen die höchsten Aktivitätswerte im Kot erst mehrere Stunden nach der höchsten ^{14}C -Ausscheidung mit dem Urin gemessen wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die Hauptmenge der im Kot gemessenen ^{14}C -Aktivität nicht durch in vitro-Kontamination, sondern durch tatsächliche fäkale Ausscheidung bedingt war.

Eine weitaus geringere Eliminierung von ^{14}C -Aktivität mit dem Kot nach oraler Gabe von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure wurden bei Mensch (BAKER et al., 1975) und Meerschweinchen (HORNIG, 1983) mit weniger als 1% der verabreichten Aktivität gemessen. Bei Makaken dagegen wurden allein 2,5% der Aktivität in den ersten 24 Stunden im Kot nachgewiesen (TILLOTSON and O'CONNOR, 1981). In früheren Untersuchungen mit Krallenaffen wurde nach oraler Gabe einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure 2,5-22,3% der Aktivität im Kot festgestellt. Die großen Unterschiede in der fäkalen Exkretion bei diesen Tieren wurden zum Teil mit der unterschiedlichen Vitamin C-Versorgung über das Futter sowie mit einer unterschiedlich raschen Darmpassage der aufgenommenen Ascorbinsäure, hergeleitet aus der jeweiligen Kotkonsistenz, begründet (GEYER, 1987).

Auch in unseren Studien mit *C. jacchus* kann aufgrund des dünneren Kots in den "Streßversuchen" bei "Django" und "Detlef" auf eine raschere Darmpassage und folglich auf eine geringere Resorptionsrate der zugeführten Ascorbinsäure geschlossen werden, aber auch auf eine größere

Kontaminationsmöglichkeit von Kot mit Urin. Die jeweilig geringeren, aber deutlich nachweisbaren ^{14}C -Anteile im Kot nach intravenöser Zufuhr des Vitamins weisen, insbesondere nachdem die Kontamination des Kots mit ^{14}C -haltigem Urin minimiert wurde, auf eine Sekretion von Ascorbinsäure oder von deren Metaboliten in den Darm hin. Dafür spricht auch, daß gegen Ende des Versuchszeitraums in allen Versuchen noch ^{14}C -Aktivität in den Fäces gemessen wurden. Dies stimmt überein mit früheren Untersuchungen bei Krallenaffen, wo aufgrund der nachweisbaren ^{14}C -Eliminierung über den Kot, lange nach Gleichverteilung einer zugeführten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure im Organismus, die Sekretion von Ascorbinsäure und/oder deren Metaboliten in den Darm vermutet wurde (GEYER, 1987).

4.6 Retention und Halbwertszeit

Die Vitamin C-Hochversorgung mit 4 g pro kg Koloniediät führte in allen Versuchen zu einer raschen ^{14}C -Eliminierung nach Zufuhr von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure und damit zu kurzen biologischen Halbwertszeiten.

Entsprechend war die Wiederfindung des Tracers in den drei Ausscheidungsfraktionen mit 83,1-91,2% der applizierten Aktivitätsmenge binnen 12 Versuchstagen relativ hoch. In den Versuchen IV und VI, in denen die geringste Wiederfindung von ^{14}C -Aktivität vorliegt, wurden im Serum der Tiere bei Versuchsende mit 0,3% der verabreichten Aktivitätsmenge etwas mehr gemessen als in den anderen Versuchen, wo dieser Anteil nur 0,2% beträgt.

Die semilogarithmisch aufgetragenen Retentionskurven sind für die jeweiligen Versuchstiere in den Abbildungen 23,24 und 25 wiedergegeben. Jede anhand der Ganzkörperretentionswerte errechnete Ausgleichsfunktion ist die Summe von zwei bzw. drei Exponentialfunktionen.

Der zwei- bis dreiphasige Verlauf der Retentionskurven läßt die Verteilung der Aktivität bei *C. jacchus* in drei Kompartimente erwarten. Der Verlauf der Retentionskurven der Versuche IV und VI läßt zwar nur die Verteilung in zwei Kompartimente erkennen, jedoch könnte die Eliminierung von ^{14}C -Aktivität aus dem zweiten Verteilungsraum in diesen Versuchen bei Versuchsende die Ausscheidung der Aktivität aus dem dritten Kompartiment noch überdecken. Dafür sprechen die in diesen Versuchen geringere Gesamtwiederfindung des Tracers und die höheren Retentionswerte der Aktivität im Serum der Tiere.

In früheren Untersuchungen an Krallenaffen erstellte GEYER (1987) anhand der Retention von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure ein 2-Kompartiment-Modell. Da jedoch diese Studie die ^{14}C -Exkretion nur in den ersten 96 Stunden nach Applikation der Aktivität berücksichtigt, wurde die mögliche Existenz eines dritten Kompartiments nicht erkannt. Auch in unseren Untersuchungen zeigen die ^{14}C -Retentionskurven in den ersten 96 Stunden nach Applikation einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure nur einen zweiphasigen Verlauf. Erst die ^{14}C -Eliminierung in der zweiten Versuchswoche läßt auf die Existenz eines dritten Verteilungsraumes bei *C. jacchus* schließen.

Beim Menschen (KALLNER et al., 1982) und beim Meerschweinchen (HORNIG and HARTMANN, 1982) führt der nach Verteilung von markierter Ascorbinsäure gemessene Aktivitätsverlauf im Plasma zu einer dreiphasigen Retentionskurve, was bei diesen Spezies ebenfalls die Verteilung der Aktivität in drei Kompartimente erwarten läßt. KALLNER et al. vermuten ein zentrales Kompartiment, das zunächst die Ascorbinsäure aufnimmt und entweder unverändert eliminiert oder mit zwei weiteren Kompartimenten austauscht, von denen das eine als Langzeitspeicher fungiert, während das andere Ort des

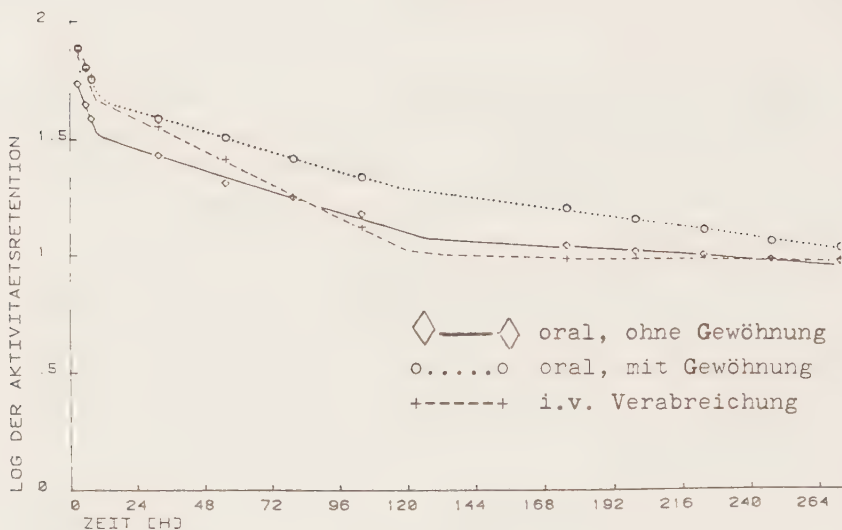


Abbildung 23 : Semilogarithmisch aufgetragener Verlauf der ^{14}C -Retention nach Zufuhr von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Django".

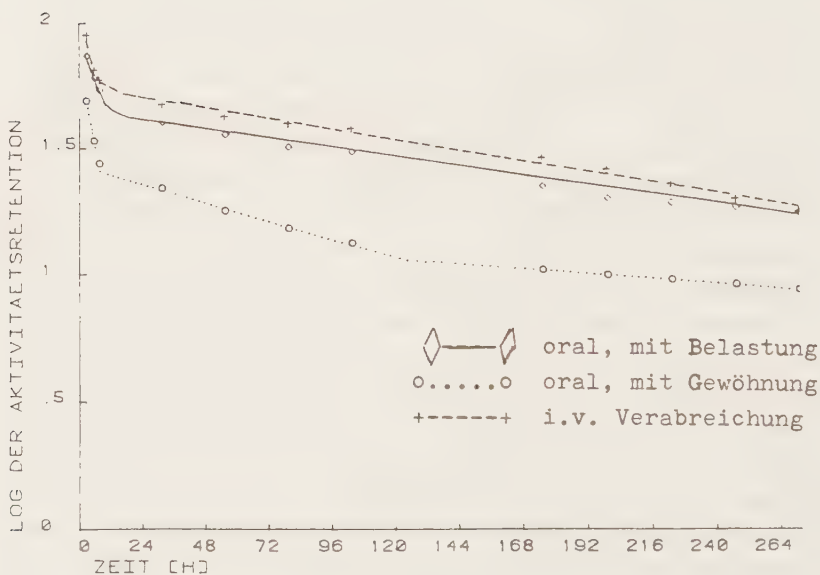


Abbildung 24: Semilogarithmisch aufgetragener Verlauf der ^{14}C -Retention nach Zufuhr von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure bei "Detlef".

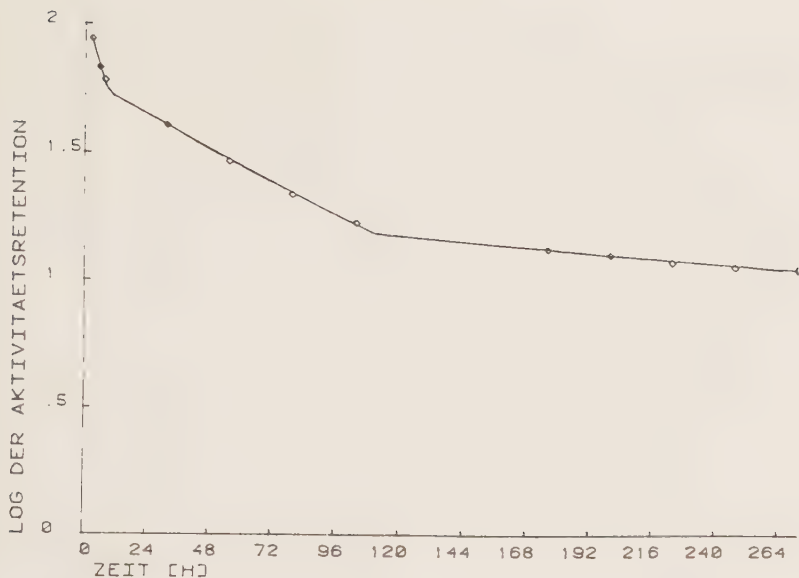


Abbildung 25: Semilogarithmisch aufgetragener Verlauf der ^{14}C -Retention nach peroraler Zufuhr von 1- ^{14}C -Ascorbinsäure und wiederholter kurzfristiger Belastung bei "Gustav" in Versuch VII.

Vitamin C-Metabolismus ist, von dem aus die Metaboliten eliminiert werden. Entsprechend könnte das erste Kompartiment in den vorliegenden Untersuchungen, das aus dem steilen Abschnitt der Kurve mit Halbwertszeiten zwischen 0,3 und 5,0 Stunden hervorgeht, den gesamten Verteilungsraum nach Resorption aus dem Darm (perorale Applikation) bzw. nach Aufnahme ins Blut (intravenöse Zufuhr) repräsentieren. In diesem Abschnitt erfolgt die gesamte $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation (siehe 4.1. und 4.2.) sowie ein Großteil der ^{14}C -Eliminierung mit dem Urin (siehe 4.3) und den Fäces (siehe 4.5). Der zweite flachere Abschnitt würde die Verstoffwechselung von Ascorbinsäure wiedergeben, während der letzte Abschnitt als Speicher des zugeführten Vitamins gedeutet werden kann. Die Halbwertszeiten der Kompartimente sowie die biologischen Halbwertszeiten sind für die jeweiligen Versuche in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Die Halbwertszeiten des ersten Verteilungsraums stimmen in etwa mit den Werten überein, die GEYER (1987) in früheren Untersuchungen für Krallenaffen, bei vergleichbarer Vitamin C-Zufuhr über das Futter, für das erste Kompartiment errechnete. Die Halbwertszeiten des jeweiligen zweiten Kompartiments sind mit der obengenannten Studie jedoch nicht zu vergleichen, da GEYER die Retention von ^{14}C -Aktivität nach Gleichverteilung im Organismus allein auf diesen zweiten Verteilungsraum bezieht, während unsere Untersuchungen ein drittes Kompartiment erkennen lassen.

Tabelle 13

Halbwertszeiten der Kompartimente

Versuch	I	II	III	IV	V	VI	VII
Kompartiment 1 (h)	1,1	3,3	2,0	0,3*	1,5	5,0*	4,1
Kompartiment 2 (h)	25	73	30	200*	38	167*	27
Kompartiment 3 (h)	538	200	885		478		342

*Die Halbwertszeiten dieser Kompartimente konnten nicht exakt bestimmt werden, da vermutlich die ^{14}C -Abgabe des zweiten Verteilungsraums bis zum Versuchsende die ^{14}C -Eliminierung aus einem möglichen dritten Kompartiment noch überdeckt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Um Aufschlüsse über den Ascorbinsäurestoffwechsel bei Krallenaffen der Spezies *Callithrix jacchus* zu gewinnen, wurde anhand der Isotopenexkretionsmethode die Ausscheidung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Ascorbinsäure und ihrer Stoffwechselprodukte in Urin, Atemluft und Kot nach peroraler und intravenöser Zufuhr sowie unter dem Einfluß von "Streß" quantitativ erfaßt. Gleichzeitig konnten mit einem neu entwickelten Trennverfahren die bisher unbekannten Hauptmetaboliten im Urin dieser Spezies aufgetrennt, identifiziert und in ihrem Anteil bestimmt werden.

Unter Streßbedingungen verstoffwechselten die Tiere die peroral zugeführte Ascorbinsäure vermehrt zu CO_2 . Bis zu 50,4% der verabreichten Aktivität wurden ohne Gewöhnung an die Versuchsbedingungen bzw. mit andauernder Belastung als $^{14}\text{CO}_2$ exhaliiert.

Die respiratorische Exkretion konnte durch kurzfristige Streßinduktion binnen weniger Minuten auf etwa das Doppelte angehoben und entsprechend der Dauer des belastenden Reizes auf einem bestimmten Niveau gehalten werden. Diese unmittelbare Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung nach Reizanwendung war selbst am zweiten Versuchstag noch möglich.

Auch bei intravenöser Zufuhr erfolgte eine zwar geringere, doch deutlich ausgeprägte Decarboxylierung des zugeführten Vitamins, was neben einer nicht auszuschließenden praeresorptiven CO_2 -Produktion bei peroraler Zufuhr, die systemische Decarboxylierung der Ascorbinsäure nachweist.

Die renale Eliminierung stellt in nahezu allen Versuchen den Hauptausscheidungsweg dar. Neben unverstoffwechselter Ascorbinsäure konnten die Dehydroascorbinsäure und die Oxalsäure nachgewiesen werden.

Die höchste Menge des unverstoffwechselten Vitamins wurde nach intravenöser Zufuhr, die höchsten Oxalsäureanteile in den Streßversuchen beobachtet, was auf einen erhöhten Vitamin C-Katabolismus unter psychischer Belastung schließen läßt.

Der Verlauf der ^{14}C -Retention läßt auf die Verteilung des Vitamins in ein initiales, rasch austauschendes Kompartiment (Halbwertszeit 20 Minuten bis wenige Stunden), in einen zweiten Verteilungsraum (Halbwertszeit 1-3 Tage) und ein weiteres sehr langsam austauschendes Kompartiment (Halbwertszeit bis zu mehreren Wochen) schließen.

SUMMARY

Studies on the ascorbic acid metabolism with the isotope excretion method in the common marmoset

To gain information about the metabolism of vitamin C in the common marmoset *Callithrix jacchus*, the excretion of 1- ^{14}C -ascorbic acid and its metabolites were measured in urine, in expired air and in feces. The labeled ascorbic acid was given orally or intravenously. A newly developed HPLC method allowed the separation, identification and determination of the previously unknown main metabolites in the urine of this species.

When the animals were stressed, a greater part of the ascorbic acid given, up to 50.4%, was decomposed to CO_2 as compared to accustomed conditions. The respiratory excretion could be doubled within a few minutes by the induction of stress. This intensified $^{14}\text{CO}_2$ -rate was maintained at a limited level as long as the stressor subsisted. This stress-dependent $^{14}\text{CO}_2$ increase could be provoked even on the second day after ^{14}C administration.

When the labeled compound was given intravenously, ascorbic acid also was broken down to CO_2 . This portion, however, was much lower than after oral intake. This demonstrates that there definitely is a systemic decarboxylation system for ascorbic acid. A preabsorptive CO_2 production can not be excluded, when ascorbic acid is given orally.

The elimination via urine constituted the main excretion in almost all trials. Besides unmetabolized ascorbic acid, dehydroascorbic acid and oxalic acid appeared in the urine. Most of the native ascorbic acid was found after i.v. injection, while the highest oxalic acid ratio was demonstrated when the animals were stressed. This indicates an increased vitamin C catabolism under stress condition.

The distribution of ascorbic acid into three compartments with differing half-lives can be suggested by the course of the ^{14}C retention curves. The first initial compartment has a short half-life (0.3-5 h), the second compartment has a half-life up to three days, and in the third one the exchange occurs very slowly (14-36 d).

LITERATURVERZEICHNIS

- ABT, A.F., L.S. VON SCHUCHING, T. ENNS (1963):
Vitamin C-requirements of man reexamined. New values
based on previously unrecognized exhalatory excretory
pathway of ascorbic acid.
Am. J. Clin. Nutr. 12, 21-29
- ANDERSON, R. (1981):
Ascorbic acid and immune functions: Mechanism of
immunostimulation.
In: Ascorbic Acid (eds.: J.N. Counsell and D.H. Hornig
p. 249-272
Applied Science Publ. London, New Jersey
- ANDERSON, R. (1982):
Effects of ascorbate on normal and abnormal leucocyte
functions.
Int. J. Vir. Nutr. Res., Suppl. 23, 23-34
- BÄSSLER, K.H. and K. LANG (1981):
Ascorbinsäure (Vitamin C).
In: Vitamine, 2. Auflage (Ed.: Bässler, K. H.)
Dr. D. Steinkopf-Verlag, Darmstadt
- BAGGIOLINI, M. (1965):
Eine einfache Technik für die Absorption von $^{14}\text{CO}_2$
und dessen direkte Messung im Flüssigkeits-
szintillationszähler.
Experientia 21, 731-733
- BAKER, E.M., N.G. LEVANDOSKI and H.E. SAUBERLICH (1963):
Respiratory catabolism in man of the degradative
intermediates of L-ascorbic-1- Cl^{14} acid.
Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y. 113, 379-378
- BAKER, E.M. J.C. SAARI, and B.M. TOLBERT (1966):
Ascorbic acid metabolism in man.
Am. J. Clin. Nutr. 19, 371-378
- BAKER, E.M., D.C. HAMMER, S.C. MARCH, B.M. TOLBERT and
J.E. CANHAM (1971):
Ascorbate sulfate: a urinary metabolite of ascorbic
acid in man.
Science 173, 826-827

- BAKER, E.M., J.E. HALVER, D.O. JOHNSEN, B.E. JOYCE, M. NIGHT and B.M. TOLBERT (1975):
Metabolism of ascorbic acid and ascorbic-2-sulfate in man and the subhuman primate.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 258, 72-80
- BEISEL, W.R. (1982):
Single nutrients and immunity.
Am. J. Clin. Nutr. 35, 423-428
- BJÖRKHED, I. and A. KALLNER (1976):
Hepatic 7- α -hydroxylation of cholesterol in ascorbate-deficient and ascorbate-supplemented guinea-pig.
J. Lipid Res. 17, 360-365
- BLASCHKE, E. and G. HERRTING (1971):
Enzymatic methylation of L-ascorbic acid by catechol-O-methyltransferase.
Biochem. Pharmacol. 20, 556-562
- BURNS, J.J., P.G. DAYTON, S. SCHULENBERG (1956):
Further observation on the metabolism of L-ascorbic acid in guinea-pig.
J. Biol. Chem. 21, 15-21
- BURNS, J., J. KANFER and P.G. DAYTON (1958):
Metabolism of L-ascorbic acid in rat kidney.
J. Biol. Chem. 232, 107-115
- CHATTERJEE, I.B., N.C. KAR and B.C. GUHA (1961):
Biosynthesis of L-ascorbic acid.
Nature 192, 163-164
- CHATTERJEE, I.B. (1973):
Evolution and the biosyntheses of ascorbic acid.
Science 182, 1271-1272
- CHATTERJEE, I.B., A.K. MAJUMDER, B.K. NANDI and N. SUBRAMANIAN (1975):
Synthesis and some major functions of vitamin C in animals.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 258, 24-47
- CHOJKIER, M., R. SPANHEIMER and B. PETERKOFISKY (1984):
Specified decreased collagen biosynthesis in scurvy dissociated from an effect on proline hydroxylation and correlated with body weight loss.
J. Clin. Invest. 72, 826-835

- CLEMETSON, C.A. (1980):
Histamine and ascorbic acid in human blood.
J. Nutr., 110, 662-668
- CURTIN, C.H. and C.G. KING (1955):
The metabolism of ascorbic acid 1-Cl⁴ and oxalic acid-Cl⁴ in the rat.
J. Biol. Chem. 216, 539-548
- DAYTON, P.G., M.M. SNELL and J.M. PEREL (1966):
Ascorbic and dehydroascorbic acids in guinea pigs and rats.
J. Nutr. 88, 338-344
- DE FAZIO, M.S., D.M. FLINT and M.D. WAHLQVIST (1981):
The effects of alcohol on plasma ascorbic acid in healthy subjects.
Am. J. Clin. Nutr. 34, 2394-2396
- DEGKWITZ, E. (1985):
Neue Aspekte der Biochemie des Vitamin C
Z. Ernährungswiss. 24, 219-230
- DE KLERK, W.A., J.P. DU PLESSIS, J.J. VAN DER WATT, A. DE JAGER and N.F. LAUBSCHER (1973a):
Vitamin C-requirements of the vervet monkey under experimental conditions.
S. Afr. Med. J. 47, 705-713
- DE KLERK, W.A., J.P. KOTZE, I.V. MENNE, M.J.A. MATTHEWS and T. McDONALD (1973b):
The influence of various dietary ascorbic acid levels on serum ascorbic acid and serum cholesterol values of the baboon during captivity.
S. Afr. Med. J. 47, 1503-1510
- DE JONG, L., S.P.J. ALBRACHT, A. KEMP (1982):
Propyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme bound iron. The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation.
Biochim. Biophys. Acta 704, 326-332
- DONNER, L.W. and K.B. HICKS (1981):
High-performance liquid chromatographic separation of ascorbic acid, erythorbic acid, dehydroascorbic acid, dehydroerythorbic acid, diketogulonic acid and diketogluconic acid.
Anal. Biochem. 115, 225-229

- DOST, F. (1968):
Grundlagen der Pharmakokinetik.
(Ed.: Dost, F.H.)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- ENGLARD, S. and SEIFTER (1986):
The biochemical functions of ascorbic acid.
Ann. Rev. Nutr. 6, 365-406
- FLURER, C., R. SCHEID and H. ZUCKER (1983):
Evaluation of a pelleted diet in a colony of marmosets
and tamarins.
Lab. Anim. Sci. 33, 264-267
- GEYER, G. (1987):
Untersuchungen zum Vitamin C-Metabolismus beim
Krallenaffen.
Vet. med. Diss., München
- GINTER, E., J. BABALA and J. CERVEN (1969):
The effect of chronic hypovitaminosis C on the
metabolism of cholesterol and atherogenesis in guinea
pigs.
J. Atheroscler. Res. 10, 341-352
- GINTER, E., O. CERNA, J. BUDLOVSKY, V. BALAZ, F. HRUBA, V.
ROCH and E. SASKO (1977):
Effect of ascorbic acid on plasma cholesterol in
humans in a long term experiment.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 47, 123-134
- GINTER, E. and L. MIKUS (1977):
Reduction of gallstone formation by ascorbic acid in
hamsters.
Experientia 33, 716-718
- GINTER, E. (1979):
Chronic marginal vitamin C deficiency: biochemistry
and pathophysiology.
Wld. Rev. Nutr. Diet 33, 104-141
- GOETZL, E.J., S.J. WASSERMANN, S. GIGLI and K.F. AUSTEN
(1974):
Enhancement of random migration and chemotactic
response of human leukocytes by ascorbic acid.
J. Clin. Invest. 53, 813-818

- GOLDSMITH, G.A. (1961):
Human requirements for vitamin C and its use in
clinical medicine.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 230-245
- GREENFIELD, N., L. POINTICORVO, I. CHASALOW and S.
LIEBERMANN (1980):
Activation and inhibition of the adrenal 21-hydroxy-
lation system cytosolic constituents: influence of
glutathione, glutathione reductase, and ascorbate.
Arch. Biochem. Biophys. 200, 232-244
- HANKES, L.V., C.R. JANSEN and M. SCHMAELER (1974):
Ascorbic acid catabolism in bantu with hemosiderosis
(Scurvey).
Biochem. Med., 9, 244-255
- HARRIS, W.S., B.A. KOTTKE, M.T.R. SUBBIAH (1979):
Bile acid metabolism in ascorbic acid deficient guinea
pigs.
Am. J. Clin. Nutr. 32, 1837-1841
- HELLMANN, L. and J.J. BURNS (1958):
Metabolism of L-ascorbic acid $l\text{-Cl}^4$ in man.
J. Biol. Chem. 230, 923-930
- HODGES, R.E., J. HOOD, J.E. CANHAM, H.E. SAUBERLICH, E.M.
BAKER (1971):
Clinical manifestation of ascorbic acid deficiency in
man.
Am. J. Clin. Nutr. 24, 432-443
- HORNIG, D., F. WEBER and O. WISS (1971):
Uptake and release of ($l\text{-}^{14}\text{C}$)-ascorbic acid and
($l\text{-}^{14}\text{C}$)-dehydroascorbic acid by erythrocytes of
guinea pigs.
Clin. Chem. Acta 31, 25-35
- HORNIG, D., F. WEBER, O. WISS (1973):
Site of intestinal absorption of ascorbic acid in
guinea pigs and rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 168-172
- HORNIG, D. (1975):
Metabolism of ascorbic acid.
World Rev. Nutr. Diet. 23, 254-258

- HORNIG, D. and D. HARTMANN (1982):
Kinetic behaviour of ascorbic acid in guinea pigs.
In: Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses,
(Eds.: Seib, P.A. and B.M. Tolbert)
American Chemical Society, Washington
Adv. Chem. Ser. 200, 293-316
- HORNIG, D., B. GLATTHAAR and U. MOSER (1983):
General aspects of ascorbic acid function and
metabolism.
In: Ascorbic Acid in Domestic Animals. Proceedings.
Workshop Skjolenaesholm, Sept. 1983.
The Royal Danish Agricultural Society Copenhagen 1984
- HUGHES, R.E., R.J. HURLEY, P.R. JONES (1980):
Dietary ascorbic acid muscle carnitine in guinea pigs.
Br. J. Nutr. 43, 385-388
- KAGAWA, Y., H. TAKIGUCHI and N. SHIMANZONO (1961):
Enzymic delactonization of dehydro-L-ascorbate in
animal tissues.
Biochim. Biophys. Acta 51, 413-415
- KAGAWA, Y. (1962):
Enzymatic studies on ascorbic acid catabolism in
animals.
I. Catabolism of 2,3-diketogulonic acid.
J. Biochem. 51, 134-144
- KAGAWA, Y. and H. TAKIGUCHI (1962):
Enzymatic studies on ascorbic acid catabolism in
animals II. Delactonization of dehydroascorbic acid .
J. Biochem. 51, 197-203
- KALLNER, A.B., D. HARTMANN and D. HORNIG (1977):
On the absorption of ascorbic acid in man.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 47, 383-388
- KALLNER, A.B., D. HARTMANN and D. HORNIG (1979):
Turnover and body pool of ascorbic acid in man.
Am. J. Clin. Nutr. 32, 530-539
- KALLNER, A.B., D. HARTMANN und D. HORNIG (1981):
On the requirements of ascorbic acid in man: Steady
state turnover and body pool in smokers.
Am. J. Clin. Nutr. 34, 1347-1355

- KALLNER, A., D. HARTMANN and D. HORNIG (1982):
Kinetics of ascorbic acid in humans.
In: Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses
(Eds.: P.A. Seib and B.M. Tolbert),
American Chemical Society, Washington
Adv. Chem. Ser. 200, 335-348
- KALLNER, A., D. HORNIG and R. PELLIKKA (1985):
Formation of carbon dioxide from ascorbate in man.
Am. J. Clin. Nutr. 41, 609-613
- KAMATH, S.K., J.M. TANG and P.O. BRAMANTE (1977):
Effect on dietary ascorbic acid on serum lipids and
lipoprotein lipase activity of adipose and cardiac
tissue in guinea pig.
Fed. Proc. Fed. Am Socs. exp. Biol. 36, 1114
- KANFER J., G. ASHWELL and J.J. Burns (1960):
Formation of L-lyxonic and L-xylonic acids from
L-ascorbic acid in the rat kidney.
J. Biol. Chem. 235, 2518-2521
- KARR, D.B., E.M. BAKER and B. M. TOLBERT (1968):
Guinea pig urinary metabolites from ascorbic acid.
Fed. Proc. 27, 256-288
- KERN, M. (1986):
Untersuchungen zum Vitamin C-Bedarf bei Krallenaffen
der Spezies Callithrix jacchus.
Vet. med. Diss., München
- KITABCHI, A.E. and W.H. WEST (1975):
Effect of steroidogenesis on ascorbic acid content and
uptake in isolated adrenal cells.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 258, 422-431
- KITABCHI, A.E. (1977):
Ascorbic acid in steroidgenesis.
Nature 215, 1385-1386
- KLAIN, G.J., J. TURNBULL and S.T. OMAE (1981):
Oxidation of l-¹⁴C-ascorbic acid in the guinea pig:
effect of the route of administration.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 51, 39-45
- KOTZE, J.P., M.J.A. MATTHEWS and W.A. DE KLERK (1974):
Effect of ascorbic acid on lipoprotein lipase activity.
S. Afr. Med. J. 48, 511-514

- KÜBLER, W. und J. GEHLER (1970):
 Zur Kinetik der enteralen Ascorbinsäure-Resorption.
 Ein Beitrag zur Berechnung nicht dosisproportionaler
 Resorptionsvorgänge.
 Int. Z. Vit. Forschung 40, 442-453
- LADU, B.N., V.G. ZANNONI (1961):
 The role of ascorbic acid in tyrosine metabolism.
 Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 175-191
- LEVINE, M.D. (1986):
 New concepts in the biology and biochemistry of
 ascorbic acid.
 N. Engl. J. Med. 314, 892-902
- MARCUSEN, D.C. and R.W. HENINGER (1976):
 Effect of ascorbic acid on the pituitary-thyroid
 system in the rat.
 J. Endocr. 70, 313-314
- McINTOSH, G.H., W. RICHMOND and R.L. HIMSWORTH (1981):
 Vitamin C-deficiency and hypercholesterolaemia in
 marmoset monkeys.
 Nutr. Rep. Int. 23, 237-243
- McNEES D.W., B.J.PONZIO, R.W. LEWIS, F.J. STEIN, R.F.SIS
 and B.M.LEVY (1982):
 Hematology of common marmosets (*Callithrix jacchus*.)
 Primates 23, 145-150
- MIRVISH, S.S., L. WALLCAVE, M. EAGAN, P. SHUBIK (1972):
 Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking
 the formation of carcinogenic N-nitrose compounds.
 Science 177, 65-68
- MORCOS, S.R., F.A. EL-SHOBAKI, Z. EL-HAWARY, N. SALEH
 (1976):
 Effect of vitamin C and carotene on the absorption of
 calcium from the intestine.
 Z. Ernährungswiss. 15, 387-390
- MOSER, U. (1987):
 Uptake of ascorbic acid by leukocytes
 Ann. N. Y. Acad. Sci. 498, 200-216

- MURPHY, B.L., D.H. KRUSHAK, J.E. MAYNARD, and D.W. BRADLEY (1974):
Ascorbic acid (vitamin C) and its effects on para-influenza type III virus infection in cotton topped marmosets.
Lab. Animal Sci. 24 (1), 229-232
- MYLLYLÄ, R., K. MAJAMAA, V. GÜNZLER, H.M. HANAUSKE-ABEL, K.I. KIVIRIKKO (1984):
Ascorbate is consumed stoichiometrically in uncoupled reaktion catalyzed by propyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase.
J. Biol. Chem. 259, 5403-5405
- ODUMOSU, A. (1981):
Ascorbic acid and cortisol metabolism in hypovitaminosis C in guinea pigs.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 52, 175-184
- OSTWALD, R., W. YAMANAKA, M. LIGHT and J. KROES (1977):
The time course of metabolic changes induced by dietary cholesterol in guinea pigs.
Atherosclerosis 26, 41-53
- PANUSH, R.S., P. KATZ, G. POWELL and L. SOMBERG (1982):
Immunopharmacologic effects of vitamin C IV.
Pertubation of mononuclear cell cyclic nucleotides.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 53, 61-67
- PATRONE, F., F. DALLEGRI, E. BONVINI, F. MINERVINI, C. SACCHETTI (1982):
Effects of ascorbic acid on neutrophil function.
Studies on normal and chronic granulomatous disease neutrophils.
Acta Vitaminol. Enzymol. 4, 163-168
- PAULING L. (1970):
Vitamin C and the common cold
(ed.: M. Freeman, San Francisco)
- PETERSON, V. E., P.A. CRAPO, J. WEININGER, H. GINSBERG and J. OLEFSKY (1975):
Quantification of plasma cholesterol and triglyceride levels in hypercholesterolemic subjects receiving ascorbic acid supplements.
Am. J. Clin. Nutr. 28, 584-587

- REED, P.I., K. SUMMERS, P.L.R. SMITH, C.L. WALTERS, B. BARTHOLOMEW, M.J. HILL, S. VENITT, D. HORNIG, J.P. BONJOUR (1982):
The effect of vitamin C on gastric juice nitrite and N-nitroso compound levels in achlorhydric subjects.
Scand. J. Gastroenterology 78, 239
- SANDSTRÖM, B. and A. CEDERBLAD (1986):
Effect of ascorbic acid on the absorption of zinc and calcium in man
Int. J. Vit. Nutr. Res. 57, 87-90
- SATO, P.H. and S. UDENFRIEND (1978):
Scurvy-prone animals including man, monkey and guinea pig do not express the gene for gulonolactone oxidase
Arch. Biochem. Biophys. 187, 158-162
- SATO, P.H. (1980):
Synthesis of ascorbic acid by implanted dialysis bag containing L-gulonolactone oxidase
Mol. Pharmacol. 18, 326-330
- SCHMIDT, K.H., H. OBERITTER, G. BRUCHELT, V. HAGMAIER and D. HORNIG (1983):
Studies on the metabolic conversion of ascorbate.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 53, 77-86
- SHARMA, S.C. (1982):
Levels of total ascorbic acid and histamine in the blood of women during the 3rd trimester of normal pregnancy
Int. J. Vit. Nutr. Res. 23, 239-256
- SPENCER, R.P., S. PURDY, R. HOELDTKE, T.M. BOWE and M.A. MARKULIS (1963):
Studies on intestinal absorption of L-ascorbic acid $1-^{14}\text{C}$.
Gastroenterology 44, 768-773
- STEVENSON, N.R. and M.K. BRUSH (1969):
Existence and characteristics of Na^+ -dependent active transport of ascorbic acid in guinea pig
Am. J. Clin. Nutr. 22, 318-326
- STEVENSON, N.R. (1974):
Active transport of L-ascorbic acid in the human ileum
Gastroenterology 67, 952-956

- SULKIN N.M. and D.F. SULKIN (1975):
Tissue changes induced by marginal vitamin C deficiency.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 258, 317-327
- TILLOTSON, J.A. (1978):
Ascorbate metabolism in the trained monkey.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 48, 374-381
- TILLOTSON, J.A. and E.L. MCGOWN (1981):
The relationship of the urinary ascorbate supplementation in the monkey.
Am. J. Clin. Nutr. 34, 2405-2411
- TILLOTSON, J.A. and R.J. O'CONNOR (1981):
Steady-state ascorbate metabolism in the monkey.
Am. J. Clin. Nutr. 34, 2397-2404
- TOLBERT, B.M., W.W. BULLEN, M. DOWNING and E.M. BAKER (1973):
Ascorbate sulfohydrolase A preparation.
Fed. Proc. 32, 931, Abstr. 4007
- TOGGENBURGER, G., M. HÄUSERMANN, B. MÜTSCH, G. GENONI, M. KESSLER, F. WEBER, D. HORNIG, B. O'NEILL and G. SEMENZA (1981):
Na⁺-dependent, potential sensitive L-ascorbate transport across the brush border membrane vesicles from kidney cortex.
Biochim. Biophys. Acta 646, 433-443
- ULLRICH, R. and W. DUPPEL (1975):
Iron- and copper-containing monooxygenases
In: The enzymes (ed.: BOYER, P.D.)
Academic Press, London-New York
3rd ed., vol XII, 253-297
- VALLANCE, S. (1977):
Relationship between ascorbic acid and serum proteins of the immune system.
Br. Med. J. II, 437-438
- WEIGHT, M.J., J.P. KOTZE, W.A. DE KLERK and N. WEIGHT (1974):
The effect of dietary ascorbic acid on cholesterol biosynthesis in vitro.
Int. J. Biochem. 5, 287-290

WEININGER, J.K. and J.C. KING (1982):

Effect of oral contraceptive agents on ascorbic acid metabolism in the rhesus monkey.

Am. J. Clin. Nutr. 35, 1408-1416

WEIS, W. (1975):

Ascorbic acid and electron transport.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 258, 190-200

WEISER, H., A. HANCK and D. HORNIG (1976):

Ascorbic acid and cholesterol interaction in guinea pigs

Nutr. Metab. 20, 206

YUNG, S., M. MAYERSOHN and J.B. ROBINSON (1981):

Ascorbic acid absorption in man: influence of divided dose and food

Life Sci. 28, 2505-2511

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zucker für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundlich gewährte Unterstützung dieser Arbeit.

Frau Dr. C. Flurer danke ich sehr herzlich für die hervorragende Betreuung.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Herrn Dr. G. Reidel für die stets hilfsbereite Unterstützung und zahlreichen wertvollen Hinweise.

Ebenso danke ich auch Herrn Dr. rer. nat., Dr. vet med. habil. W. A. Rambeck für die immer freundlich gewährte Hilfe.

Herrn Dr. W.E. Kollmer und Herrn Dr. D. Berg, Abteilung für Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF) in München-Neuherberg, möchte ich vor allem für die Möglichkeit, in einem Tierstall dieser Abteilung Tierversuche durchführen zu können, danken, darüber hinaus aber auch für ihr großes Interesse an der Arbeit und ihre vielen hilfreichen Ratschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, mit Tieren des Max von Pettenkofer-Institutes für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität München Versuche durchführen zu können.

Außerdem danke ich dem Tierpflegepersonal des Instituts für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Abteilung für Nuklearbiologie in der GSF, München-Neuherberg für ihre sehr freundliche Hilfe.

LEBENS LAUF

Günter Siems

23.03.1958	geboren in Stadtlohn Vater: Bernhard Siems, Arbeiter gestorben 1980 Mutter: Katharina Siems, geb. Klümper
1964 - 1968	Besuch der Volksschule in Stadtlohn
1968 - 1974	Besuch der öffentlichen Realschule für Jungen in Stadtlohn
1974 - 1977	Besuch des Gymnasiums Gregorianum in Vreden
14.06.1977	Abitur
1977 - 1979	Zivildienst in der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker in München
1980 - 1986	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität- München
08.07.1986	Staatsexamen
06.02.1987	Approbation als Tierarzt
seit 01.09.1986	Anfertigung der Dissertation am Institut für Physiologie, Physio- logische Chemie und Ernährungs- physiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
15.09.1986 - 31.03.87	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am gleichen Institut

